

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 723**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2003 E 10184907 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2290091**

54 Título: **Virus recombinantes del sarampión que expresan epítopes de antígenos de virus ARN y uso de los virus recombinantes para la preparación de composiciones de vacuna**

30 Prioridad:

20.06.2002 EP 02291550

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

15.09.2017

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (50.0%)
25-28 rue du Docteur Roux
75724 Paris Cédex 15, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TANGY, FRÉDÉRIC;
LORIN, CLARISSE;
MOLLET, LUCILE y
DELEBECQUE, FRÉDÉRIC**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 632 723 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

Virus recombinantes del sarampión que expresan epítopes de antígenos de virus ARN y uso de los virus recombinantes para la preparación de composiciones de vacuna

5 La invención se refiere a virus recombinantes del sarampión que expresan epítopes de antígenos del virus de la fiebre amarilla o el virus del Nilo occidental y a su uso para la preparación de composiciones de vacuna.

El virus del sarampión es un miembro del orden *mononegavirales*, es decir, virus con un genoma ARN de cadena negativa no segmentado. El genoma no segmentado del virus del sarampión (MV del inglés "measles virus") tiene una polaridad anti-mensajero que produce un ARN genómico que ni se traduce *in vivo* o *in vitro* ni es infeccioso cuando se purifica.

10 Se ha estudiado la transcripción y replicación de virus ARN de cadena (-) no segmentada y su ensamblaje como partículas virales y se ha presentado especialmente en Fields virology (3ª edición, vol. 1, 1996, Lippincott - Raven publishers - Fields BN et al.). La transcripción y replicación del virus del sarampión no implican el núcleo de las células infectadas sino que en cambio tiene lugar en el citoplasma de dichas células infectadas. El genoma del virus del sarampión comprende genes que codifican seis proteínas estructurales principales a partir de los seis genes (denominados N, P, M, F, H y L) y dos proteínas no estructurales adicionales a partir del gen P. El orden de los genes es el siguiente: 3'-I, N, P (incluyendo C y V), M, F, H, y la proteína polimerasa grande L en el extremo 5'. El genoma comprende adicionalmente regiones no codificantes en la región intergénica IWF; esta región no codificante contiene aproximadamente 1000 nucleótidos de ARN no traducido. Los genes citados codifican respectivamente el péptido líder (gen I), las proteínas de la nucleocápside del virus, es decir, la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), y la proteína grande (L) que se ensamblan alrededor del ARN genómico para proporcionar la nucleocápside. Los otros genes codifican las proteínas de la envuelta viral incluyendo las proteínas hemaglutinina (H), de fusión (F) y de matriz (M).

25 Se ha aislado el virus del sarampión y se han obtenido vacunas vivas atenuadas del aislado del MV Edmonston en 1954 (Enders, J. F., y T. C. Peebles. 1954. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86:277-286.), por pases en serie en células renales o amnióticas humanas primarias. Las cepas usadas después se adaptaron para fibroblastos embrionarios de pollo (FEP) para producir semillas Edmonston A y B (Griffin, D., y W. Bellini. 1996. Measles virus, pág. 1267-1312. En B. Fields, D. Knipe, et al. (ed.), Virology, vol. 2. Lippincott - Raven Publishers, Filadelfia). Edmonston B se autorizó en 1963 como la primera vacuna contra el MV. Pases adicionales de Edmonston A y B en FEP produjeron los virus Schwarz y Moraten más atenuados (Griffin, D., y W. Bellini. 1996. Measles virus, pág. 1267-1312. En B. Fields, D. Knipe, et al. (ed.), Virology, vol. 2. Lippincott - Raven Publishers, Filadelfia) cuyas secuencias se ha demostrado recientemente que son idénticas (Parks, C. L., R. A. Lerch, P. Walpita, H. P. Wang, M. S. Sidhu, y S. A. Udem. 2001. Analysis of the noncoding regions of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. J Virol. 75:921-933; Parks, C. L., R. A. Lerch, P. Walpita, H. P. Wang, M. S. Sidhu, y S. A. Udem. 2001. Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. J Virol. 75:910-920). Como la vacuna Edmonston B era reactogénica, se abandonó en 1975 y se reemplazó por la vacuna Schwarz/Moraten que es actualmente la vacuna contra el sarampión más ampliamente usada en el mundo (Hilleman, M. 2002. Current overview of the pathogenesis and prophylaxis of measles with focus on practical implications. Vaccine. 20: 651-665). También se usan otras varias cepas de vacuna: AIK-C, Schwarz F88, CAM70, TD97 en Japón, Leningrad-16 en Rusia, y Edmonston Zagreb. Las cepas chinas CAM70 y TD97 no se obtuvieron de Edmonston. Las vacunas Schwarz/Moraten y AIK-C se producen en FEP. La vacuna Zagreb se produce en células diploides humanas (WI38).

La vacuna viva atenuada obtenida de la cepa Schwarz está comercializada por Aventis Pasteur (Lyon Francia) con el nombre comercial Rouvax®.

45 En un trabajo notable y pionero, Martin Billeter y sus colegas clonaron el ADNc infeccioso correspondiente al antigenoma del MV Edmonston y establecieron un procedimiento genético original y eficaz para recuperar el virus correspondiente (Radecke, F., P. Spielhofer, H. Schneider, K. Kaelin, M. Huber, K. Dötsch, G. Christiansen, y M. Billeter., 1995. Rescue of measles viruses from cloned DNA. EMBO Journal. 14:5773-5784) y documento WO 97/06270. Desarrollaron un vector Edmonston para la expresión de genes foráneos (Radecke, F., y M. Billeter. 1997. Reverse genetics meets the nonsegmented negative-strand RNA viruses. Reviews in Medical Virology. 7:49-63.) y demostraron su gran capacidad de inserción (hasta 5 kb) y su alta estabilidad en la expresión de transgenes (Singh, M., y M. Billeter. 1999. A recombinant measles virus expressing biologically active human interleukin-12. J. Gen. Virol. 80:101-106; Singh, M., R. Cattaneo, y M. Billeter. 1999. A recombinant measles virus expressing hepatitis B virus surface antigen induces humoral immune responses in genetically modified mice. J. Virol. 73:4823-4828; Spielhofer, P., T. Bachi, T. Fehr, G. Christiansen, R. Cattaneo, K. Kaelin, M. Billeter, y H. Nairn. 1998. Chimeric measles viruses with a foreign envelope. J. Virol. 72:2150-2159; Wang, Z., T. Hangartner, L. Cornu, A. Martin, M. Zuniga, M. Billeter, y H. Nairn. 2001. Recombinant measles viruses expressing heterologous antigens of mumps and simian immunodeficiency viruses. Vaccine. 19:2329-2336. Este vector se clonó a partir de la cepa Edmonston B del MV propagado en células HeLa (Ballart, I., D. Eschle, R. Cattaneo, A. Schmid, M. Metzler, J. Chan, S. Pifko-Hirst, S. A. Udem, y M. A. Billeter. 1990. Infectious measles virus from cloned cDNA. Embo J. 9:379-384).

Además, se ha producido virus recombinante del sarampión que expresa el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y ha demostrado inducir respuestas inmunes humorales en ratones genéticamente modificados (Singh M. R. et al., 1999, J. virol. 73: 4823-4828).

5 También se ha producido virus recombinante del sarampión de la cepa de Edmonston B que expresa las proteínas env, gag o pol de SIV y HIV y se mostró que inducían una respuesta inmune humoral y celular en modelos animales (Tangy F et al., AIDS vaccine 2001 Conference, 5-8 de septiembre de 2001, resumen N° 225, Measles vaccine as a potential vector for AIDS vaccination).

10 La vacuna contra el MV induce una inmunidad muy eficaz, de por vida después de una única inyección de baja dosis (10^4 DICT₅₀) (33, 34). La protección está mediada tanto por anticuerpos como por células T CD4+ y CD8+. El genoma del MV es muy estable y nunca se ha observado reversión a patogenicidad con esta vacuna. El MV se replica exclusivamente en el citoplasma, descartando la posibilidad de integración en el ADN del hospedador. Además, se ha establecido un clon de ADNc infeccioso correspondiente al anti-genoma de la cepa Edmonston del MV y un procedimiento para recuperar el virus correspondiente (35). Este ADNc se ha creado en un vector para expresar genes foráneos (36). Puede albergar hasta 5 kb de ADN foráneo y es genéticamente muy estable (37, 38, 15 39).

A partir de la observación de que las propiedades del virus del sarampión y especialmente su capacidad de provocar elevados títulos de anticuerpos neutralizantes *in vivo* y su propiedad de ser un potente inductor de respuestas inmunes celulares de larga duración, los inventores han propuesto que puede ser un buen candidato para la preparación de composiciones que comprendan virus recombinantes infecciosos que expresen péptidos o polipéptidos antigénicos de determinados virus ARN, incluyendo especialmente retrovirus o flavivirus, para inducir anticuerpos neutralizantes contra dicho virus ARN y especialmente dichos retrovirus o flavivirus que podrían ser preferiblemente adecuados para conseguir al menos algún grado de protección contra dichos virus ARN, especialmente retrovirus o flavivirus, en animales y más preferiblemente en hospedadores humanos. Especialmente, las cepas de MV y en particular las cepas de vacuna se han elegido en la presente invención como vectores 20 candidatos para inducir inmunidad tanto contra el virus del sarampión como contra virus ARN cuyo constituyente se expresa en el MV recombinante diseñado, en poblaciones de bebés expuestos porque ellos no tienen inmunidad contra el MV. Las poblaciones adultas, incluso individuos ya inmunizados contra el MV, sin embargo, también pueden beneficiarse de la inmunización con MV recombinante porque la readministración del virus MV en forma recombinante de la presente invención puede provocar un refuerzo de anticuerpos anti-MV.

30 Entre los flavivirus de interés, los inventores han elegido algunos que son patógenos humanos importantes. Ejemplos desvelados en el presente documento son el virus de la fiebre amarilla (YFV del inglés Yellow Fever Virus) y el virus del Nilo occidental (WNV del inglés West Nile Virus).

El YFV y el WNV pertenecen a la familia *Flaviviridae* descrita en Fields virology (3ª edición, vol. 1, 1996, Lippincott - Raven publishers - Fields BN et al.).

35 La solicitud también desvela un virus recombinante *mononegavirales* que expresa una secuencia heteróloga de aminoácidos, siendo capaz dicho virus recombinante de provocar una respuesta inmune humoral y/o celular contra dicha secuencia heteróloga de aminoácidos incluyendo en individuos que tienen inmunidad preexistente contra el virus del sarampión.

40 En una primera realización, la invención proporciona especialmente virus recombinantes del sarampión capaces de expresar antígenos y especialmente epítopes de flavivirus.

La invención también se refiere a construcciones de ácido nucleico, especialmente a construcciones recombinantes de ácido nucleico que expresan los virus recombinantes del sarampión y que expresan con los mismos antígenos o epítopes de antígenos de flavivirus.

45 La invención también se refiere a procesos para la preparación de dichos virus recombinantes del sarampión y especialmente se refiere a la producción dicho MV recombinante en sistemas de recuperación.

La invención también se refiere a composiciones que comprenden dichos virus recombinantes del sarampión como principios activos para la protección de hospedadores, especialmente hospedadores humanos, contra enfermedades relacionadas con infecciones por dichos flavivirus. Ejemplos desvelados en el presente documento son virus de la fiebre amarilla o virus del Nilo occidental.

50 Se han desvelado secuencias de ácido nucleico en la solicitud de patente internacional WO 98/13501, especialmente una secuencia de ADN de 15.894 nucleótidos correspondiente a una copia de ADN del ARN mensajero con sentido de cadena positiva (antigenómica) de diversas cepas tipo silvestre de sarampión para vacunas, incluyendo la cepa de tipo silvestre Edmonston, la cepa Moraten y la cepa Schwarz que es idéntica a la cepa Moraten excepto por las posiciones de los nucleótidos 4917 y 4924 en que la cepa Schwarz tiene una « C » en lugar de una « T ».

- 5 Para producir virus recombinantes del sarampión, se ha desarrollado un sistema de recuperación para la cepa del MV Edmonston y se ha descrito en la solicitud de patente internacional WO 97/06270. La descripción de dicho sistema de recuperación está contenida en el documento WO 97/06270, y se hace referencia especialmente a los ejemplos de esta solicitud internacional, incluyendo los ejemplos referidos a células y virus, a la generación de la línea celular 293-3-46, construcciones plasmídicas, la transfección de plásmidos y la recolección de productos génicos informadores, la configuración experimental para recuperar el MV, células auxiliares que expresan de forma estable las proteínas N y P del MV así como la ARN polimerasa T7, la recuperación del MV usando células auxiliares 293-3-46 y la caracterización del MV recuperado.
- 10 El sistema de recuperación desvelado en el documento WO 97/06270 se ha desarrollado adicionalmente para incluir una etapa de choque térmico descrita en Parks C. L. et al., 1999, J. virol. 73: 3560-3566.
- La invención por tanto se refiere a virus recombinantes del sarampión que expresan una secuencia heteróloga de aminoácidos procedente de un antígeno de un flavivirus determinado, donde dicho virus recombinante del sarampión es capaz de provocar una respuesta inmune humoral y/o celular contra dicho flavivirus o contra tanto el virus del sarampión como contra dicho flavivirus.
- 15 La expresión « secuencia heteróloga de aminoácidos » se refiere a una secuencia de aminoácidos que no se obtiene de los antígenos de virus del sarampión, derivándose, por consiguiente, dicha secuencia heteróloga de aminoácidos de un flavivirus de interés para establecer una respuesta inmune en un hospedador, especialmente en un ser humano y preferiblemente para establecer protección contra una infección por dicho flavivirus.
- 20 La secuencia heteróloga de aminoácidos expresada en virus recombinantes del sarampión de acuerdo con la invención es tal que es capaz de provocar una respuesta inmune humoral y/o celular en un hospedador determinado, contra el flavivirus a partir del cual se ha originado. Por consiguiente, esta secuencia de aminoácidos es una que comprende al menos un epítotope de un antígeno, especialmente un epítotope conservado, estando expuesto dicho epítotope de forma natural en el antígeno u obteniéndose o exponiéndose como resultado de una mutación o modificación o combinación de antígenos.
- 25 Los antígenos usados para la preparación de los virus recombinantes del sarampión son especialmente antígenos de envuelta de flavivirus. Sin embargo, pueden usarse ventajosamente otros antígenos flavivirales para obtener virus recombinantes del sarampión capaces de provocar anticuerpos contra dichos flavivirus, y la invención se refiere, en una realización particular, a antígenos a partir de los cuales pueden obtenerse secuencias de aminoácidos que provoquen la producción de anticuerpos neutralizantes contra el flavivirus. De acuerdo con otra realización de la invención, la secuencia de aminoácidos de estos antígenos alternativa o adicionalmente también provoca una respuesta inmune celular contra los flavivirus.
- 30 La solicitud también desvela antígenos de envuelta del virus de la fiebre amarilla o el virus del Nilo occidental.
- De acuerdo con una realización preferida de la invención, el virus recombinante del sarampión de la invención se obtiene dentro de un sistema de recuperación para la preparación de virus infecciosos del sarampión. Por consiguiente, el virus recombinante del sarampión es un virus infeccioso del sarampión recuperado de un sistema de recuperación.
- 35 Un virus recombinante del sarampión particular desvelado en la solicitud se obtiene de la cepa Edmonston del virus del sarampión.
- 40 El virus recombinante del sarampión de acuerdo con la invención se obtiene de la cepa Schwarz y especialmente de una cepa Schwarz de vacuna aprobada tal como la producida con el nombre comercial Rouvax[®], disponible en Aventis Pasteur (Francia).
- 45 La invención por tanto proporciona un virus recombinante del sarampión que se recupera a partir de células auxiliares transfectadas con un ADNc que codifica el ARN antígenómico (cadena (+)) del virus del sarampión, estando dicho ADNc recombinado con una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia heteróloga de aminoácidos de ARN flaviviral.
- 50 La expresión « codificante » en la definición anterior abarca la capacidad del ADNc de permitir la transcripción de un ARN antígenómico (+) de longitud completa, sirviendo dicho ADNc especialmente como molde para la transcripción. Por consiguiente, cuando el ADNc es una molécula bicatenaria, una de las cadenas tiene la misma secuencia de nucleótidos que el ARN de cadena antígenómica (+) del virus del sarampión, excepto en que los nucleótidos « U » están sustituidos por « T » en el ADNc. Dicho ADNc es el inserto correspondiente al virus del sarampión, contenido en el plásmido pTM-MV Schw depositado con el N° I-2889 en el CNCM París, Francia) el 12 de junio de 2002. Este plásmido está representado en la figura 2A.
- 55 La expresión "ADNc" usada para la descripción de la secuencia de nucleótidos de la molécula de la invención simplemente se refiere al hecho de que originalmente dicha molécula se obtiene por transcripción inversa del genoma ARN genómico (-) de longitud completa de partículas virales del virus del sarampión.

- 5 Esto no debería considerarse como una limitación de los métodos usados para su preparación. La invención por tanto abarca, dentro de la expresión "ADNc", todos los ADN con la condición de que tenga la secuencia de nucleótidos definida anteriormente. Por tanto están incluidos ácidos nucleicos purificados, incluyendo ADN, dentro del significado de ADNc de acuerdo con la invención, con la condición de que dicho ácido nucleico, especialmente ADN cumpla las definiciones dadas anteriormente.
- 10 Las células auxiliares de acuerdo con el sistema de recuperación se transfectan con un vector de transcripción que comprende el ADNc que codifica el ARN antigenómico (+) de longitud completa del virus del sarampión, cuando dicho ADNc se ha recombinado con una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia heteróloga de aminoácidos de interés (secuencia heteróloga de nucleótidos) y dichas células auxiliares se transfectan adicionalmente con un vector de expresión o varios vectores de expresión que proporcionan las funciones auxiliares que incluyen aquellas que posibilitan la expresión de proteínas de acción en trans del virus del sarampión, es decir, las proteínas N, P y L y proporcionan la expresión de una ARN polimerasa para posibilitar la transcripción del ADNc recombinante y la replicación del ARN viral correspondiente.
- 15 La solicitud también desvela la preparación de virus recombinantes del sarampión que albergan epítopes de antígenos de retrovirus HIV. Desvela especialmente un virus recombinante del sarampión que expresa una secuencia heteróloga de aminoácidos que se obtiene de un antígeno de envuelta del HIV y que se obtiene especialmente de una proteína de envuelta o glicoproteína del HIV-1.
- Los antígenos de interés a este respecto son especialmente gp160, gp120 y gp41 de HIV-1 o gp140, GAG o TAT de HIV-1.
- 20 En una realización particular desvelada en la solicitud, la secuencia heteróloga de aminoácidos se obtiene de una proteína recombinante gp160, gp120 de HIV-1 o gp140, GAG o TAT de HIV-1.
- La solicitud desvela en particular un virus recombinante del sarampión donde los bucles V1, V2 y/o V3 del antígeno gp120 (o gp160) están delecionados o delecionados en parte, individualmente o en combinación de tal modo que los epítopes conservados están expuestos en el antígeno gp120 recombinante obtenido.
- 25 Los bucles V1, V2 y V3 del antígeno gp120 (o gp160) de HIV-1 se han desvelado especialmente en Fields virology (Fields B.N. et al. - Lippincott Raven publishers 1996, pág. 1953-1977).
- La solicitud también desvela un virus recombinante del sarampión que es tal que expresa una secuencia heteróloga de aminoácidos obtenida del antígeno gp120 (o gp160) de HIV-1, donde los bucles V1, V2 y/o V3 del antígeno gp120 (o gp160) están sustituidos o sustituidos en parte, individualmente o en combinación, de tal modo que los epítopes conservados estén expuestos en el antígeno gp120 (o gp160) recombinante obtenido.
- 30 La solicitud también desvela un virus recombinante del sarampión que expresa una secuencia heteróloga de ADN obtenida de un antígeno de envuelta de HIV-1 que se obtiene del antígeno gp120 de tal modo que los bucles V1 y V2 están delecionados y el bucle V3 está sustituido por la secuencia AAELDKWASAA.
- 35 La solicitud también desvela un virus recombinante del sarampión que expresa una secuencia heteróloga de aminoácidos seleccionada entre gp160ΔV3, gp160ΔV1V2, gp160ΔV1V2V3, gp140ΔV3, gp140ΔV1V2, gp140ΔV1V2V3, estando dichas secuencias heterólogas de aminoácidos esquemáticamente representadas en la figura 1.
- La solicitud también desvela virus recombinantes del sarampión definidos de acuerdo con las afirmaciones anteriores, donde la secuencia de aminoácidos se obtiene de un antígeno del virus de la fiebre amarilla seleccionado entre las proteínas de envuelta (Env) o NS1 o mutantes inmunogénicos de las mismas.
- 40 La solicitud también desvela virus recombinantes del sarampión definidos de acuerdo con las afirmaciones anteriores, donde la secuencia de aminoácidos se obtiene de un antígeno del virus del Nilo occidental seleccionado entre la proteína de envuelta (E), premembrana (preM) o mutantes inmunogénicos de las mismas.
- 45 La invención también se refiere a virus recombinantes del sarampión o a partículas tipo virus (VLP del inglés "virus like particles") que expresan dos o múltiples antígenos de flavivirus, contra los que se busca una respuesta inmune. Dichos virus recombinantes del sarampión o VLP pueden expresar ventajosamente antígenos de diferentes virus y por tanto proporcionar inmunógenos contra diversos virus.
- La invención se refiere adicionalmente a virus recombinantes del sarampión de acuerdo con una cualquiera de las definiciones anteriores, donde el ADNc necesario para la expresión de las partículas virales, que está comprendido dentro del vector pTM-MVSchw está recombinado con la secuencia ATU de la figura 8 o la secuencia ATU ilustrada en la figura 2C, estando dicha ATU insertada en una posición del vector pTM-MVSchw que aprovecha la ventaja del gradiente del genoma viral para permitir diversos niveles de expresión de la secuencia transgénica que codifica la secuencia heteróloga de aminoácidos insertada en dicha ATU. La invención posibilita ventajosamente la inserción de dichas secuencias heterólogas de ADN en una secuencia que se denomina Unidad de Transcripción Adicional (ATU
- 50

del inglés Additional Transcription Unit) especialmente una ATU como se desvela por Billeter et al. en el documento WO 97/06270.

5 Las propiedades inmunológicas ventajosas de los virus recombinantes del sarampión de acuerdo con la invención pueden mostrarse en un modelo animal que se elige entre animales susceptible a los virus del sarampión y donde se determina la respuesta inmune humoral y/o celular contra el antígeno heterólogo y/o contra el virus del sarampión.

Entre dichos animales adecuados a usar como modelo para la caracterización de la respuesta inmune, los especialistas en la técnica pueden usar especialmente ratones y especialmente ratones recombinantes susceptibles a los virus del sarampión, o en monos.

10 En una realización preferida de la invención, el virus recombinante del sarampión de la invención es adecuado para provocar anticuerpos neutralizantes contra la secuencia heteróloga de aminoácidos en un modelo animal de mamífero susceptible al virus del sarampión. Especialmente, esta respuesta inmune que comprende provocar anticuerpos neutralizantes puede buscarse en ratones o monos recombinantes.

15 Como se describe en el presente documento, especialmente cuando la secuencia heteróloga de aminoácidos se deriva de una de las proteínas de envuelta de HIV-1 y donde provoca anticuerpos capaces de neutralizar un aislado de HIV primaria, la respuesta se ensaya ventajosamente en células indicadoras tales como células P4-CCR5 disponibles en el NIH (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program). (Charneau P. et al. - 1994 - J. Mol. Biol. 241: 651-662).

20 De acuerdo con otra realización preferida, el virus recombinante del sarampión de acuerdo con la invención provoca anticuerpos neutralizantes contra la secuencia heteróloga de aminoácidos en un mamífero, con un título de al menos 1/40000 cuando se mide en ELISA, y un título neutralizante de al menos 1/20.

25 La invención también se refiere a una secuencia de nucleótidos del virus recombinante del sarampión que comprende un replicón que comprende (i) una secuencia de ADNc que codifica el ARN antígenómico (+) de longitud completa del virus del sarampión unido de forma funcional a (ii) un secuencia de control de la expresión y (iii) una secuencia heteróloga de ADN que codifica una determinada secuencia heteróloga de aminoácidos, estando dicha secuencia heteróloga de ADN clonada en dicho replicón en condiciones que permiten su expresión y en condiciones que no interfieren con la transcripción y la replicación de dicha secuencia de ADNc, teniendo dicho replicón una cantidad total de nucleótidos que es un múltiplo de seis.

Una secuencia de ADNc particular usada en el virus recombinante de la invención es la secuencia del ADNc de la cepa Schwarz representada en la figura 11. Dicho ADNc se obtiene de pTM-MVSchw.

30 pTM-MVSchw es un plásmido derivado de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus del sarampión, la cepa de vacuna Schwarz, bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7. Su tamaño es de 18967 nt.

La invención también se refiere a un vector de virus recombinante del sarampión que comprende la secuencia de nucleótidos del virus recombinante del sarampión definida anteriormente.

35 La « regla de seis » se expresa en el hecho de que la cantidad total de nucleótidos presentes en el ADNc recombinante resultante de la recombinación de la secuencia de ADNc obtenida de la transcripción inversa del ARN antígenómico del virus del sarampión, y la secuencia heteróloga de ADN finalmente suman una cantidad total de nucleótidos que es un múltiplo de seis, una regla que permite la replicación eficaz del ARN genómico del virus del sarampión.

40 Un vector del virus recombinante del sarampión preferido de acuerdo con la definición anterior es tal que el vector viral de ADN heterólogo donde la secuencia heteróloga de ADN está clonada dentro de una Unidad de Transcripción Adicional (ATU) insertada en el ADNc correspondiente al ARN antígenómico del virus del sarampión.

La unidad de transcripción adicional (ATU) se desvela en la figura 2A; puede modificarse con la condición de que finalmente posibilite que el replicón obtenido en el vector cumpla la regla de seis.

45 La localización de la ATU dentro del ADNc obtenido del ARN antígenómico del virus del sarampión puede variar a lo largo de dicho ADNc. Sin embargo está localizado en tal sitio que se beneficiará del gradiente de expresión del virus del sarampión.

50 Este gradiente corresponde con la abundancia de ARNm de acuerdo con la posición del gen relativa al extremo 3' del molde. Por consiguiente, cuando la polimerasa opera sobre el molde (el ARN genómico y antígenómico o los ADNc correspondientes), sintetiza más ARN creado a partir de genes corriente arriba que de genes corriente abajo. Este gradiente de abundancia de ARNm es, sin embargo, relativamente suave para el virus del sarampión. Por lo tanto, la ATU o cualquier sitio de inserción adecuado para clonar la secuencia heteróloga de ADN puede propagarse a lo largo del ADNc, con una realización preferida para un sitio de inserción y especialmente en una ATU, presente en la parte N-terminal de la secuencia y especialmente dentro de la región corriente arriba del gen L del virus del

sarampión y ventajosamente corriente arriba del gen M de dicho virus y más preferiblemente corriente arriba del gen N de dicho virus.

5 Dependiendo del sitio de expresión y el control de la expresión del ADN heterólogo, el vector de la invención permite la expresión de la secuencia heteróloga de aminoácidos como una proteína de fusión con una de las proteínas del virus del sarampión.

Como alternativa, el sitio de inserción de la secuencia de ADN en el ADNc del virus del sarampión puede elegirse de tal modo que el ADN heterólogo exprese la secuencia heteróloga de aminoácidos en una forma que no sea una proteína de fusión con una de las proteínas del virus del sarampión.

10 El vector del virus recombinante del sarampión de acuerdo con la invención contiene una secuencia heteróloga de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos flaviviral.

Como se desvela en el presente documento, esta secuencia de aminoácidos se obtiene de un antígeno de flavivirus, especialmente el virus de la fiebre amarilla o el virus del Nilo occidental.

La solicitud desvela la posibilidad de que la secuencia heteróloga de aminoácidos codificada por el vector del virus recombinante del sarampión se obtiene de un antígeno de envuelta de un retrovirus HIV, especialmente de HIV-1.

15 En una realización desvelada en la solicitud, esta secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia heteróloga de ADN se selecciona entre los antígenos gp160, gp120 o gp41 del HIV-1, o gp140 de HIV-1, o una versión mutada de dichos antígenos.

20 Como resultado que se espera por la expresión del vector del virus recombinante del sarampión de la invención, es la producción de una respuesta inmune, especialmente una respuesta inmune humoral y/o celular, contra la secuencia heteróloga de aminoácidos codificada por el vector, se prefiere que la secuencia heteróloga de ADN usada sea una que codifique un antígeno o un antígeno mutado que posibilite la exposición de epítopes neutralizantes sobre el producto de expresión producido de dicho vector.

En una realización particular, la secuencia heteróloga de aminoácidos expresada, puede exponer epítopes que no son accesibles o no se forman en el antígeno nativo del que deriva la secuencia heteróloga de aminoácidos.

25 En una realización desvelada en la solicitud, la secuencia heteróloga de ADN codifica gp160ΔV3, gp160ΔV1V2, gp160ΔV1V2V3, gp140ΔV3, gp140ΔV1V2, gp140ΔV1V2V3.

Como se describe en el presente documento, secuencias heterólogas de aminoácidos se desvelan especialmente en la figura 1 y pueden prepararse de acuerdo con métodos bien conocidos partiendo de secuencias de antígenos o secuencias de ADN correspondientes de dichos antígenos obtenidos de diversos aislados de HIV-1.

30 De acuerdo con la invención, el vector del virus recombinante del sarampión está diseñado de tal modo que las partículas producidas en células auxiliares transfectadas o transformadas con dicho vector que contiene el ADN que codifica el ARN antígenómico (+) de longitud completa del virus del sarampión, originado a partir de la cepa Schwarz del virus del sarampión adaptada para vacunación, posibilitan la producción de partículas virales para su uso en composiciones inmunogénicas, preferiblemente composiciones protectoras o incluso de vacuna.

35 Entre las cepas del virus del sarampión adaptadas para vacunación, se puede citar la cepa Edmonston B. y la cepa Schwarz, estando la última distribuida por la compañía Aventis Pasteur (Lyon Francia) como una cepa de vacunación aprobada del virus del sarampión.

Las secuencias de nucleótidos de la cepa Edmonston B. y de la cepa Schwarz, se han desvelado en el documento WO 98/13505.

40 Para preparar el vector del virus recombinante del sarampión de la invención, los inventores han diseñado el plásmido pTM-MV Schw que contiene el ADNc resultante de la transcripción inversa del ARN antígenómico del virus del sarampión y una secuencia de control de la expresión adaptada que incluye un promotor y un terminador para la polimerasa T7.

El vector del virus recombinante del sarampión de acuerdo con la invención es preferiblemente un plásmido.

45 La solicitud desvela vectores obtenidos con la secuencia de nucleótidos de la cepa Edmonston B. depositados el 12 de junio de 2002 especialmente:

pMV2(EdB)gp160[delta]V3HIV89.6P	CNCM I-2883
pMV2(EdB)gp160HIV89.6P	CNCM I-2884
pMV2(EdB)gp140HIV89.6P	CNCM I-2885

ES 2 632 723 T3

pMV3(EdB)gp140[delta]V3HIV89.6P	CNCM I-2886
pMV2(EdB)-NS1YFV17D	CNCM I-2887
pMV2(EdB)-EnvYFV17D	CNCM I-2888.

La solicitud también desvela otros vectores obtenidos con la secuencia de nucleótidos de la cepa Schwarz, depositados en el CNCM el 26 de mayo de 2003:

pTM-MVSchw2-Es(WNV)	CNCM I-3033
pTM-MVSchw2-GFPbis -	CNCM I-3034
pTM-MVSchw2-p17p24[delta]myr(HIVB)	CNCM I-3035
pTM-MVSchw3-Tat(H IV89-6p)	CNCM I-3036
pTM-MVschw3-GFP	CNCM I-3037
pTM-MVSchw2-Es (YFV)	CNCM I-3038 and

los vectores depositados en el CNCM el 19 de junio de 2003:

pTM-MVSchw2-gp140 [delta] V1 V2 V3 (HIV89-6)	CNCM I-3054
pTM-MVSchw2-gp140 [delta] V3 (HIV89-6)	CNCM I-3055
pTM-MVSchw2-gp160 [delta] V1 V2 V3 (HIV89-6)	CNCM I-3056
pTM-MVSchw2-gp160 [delta] V1 V2 (HIV89-6)	CNCM I-3057
pTM-MVSchw2-Gag SIV239 p17-p24 [delta] myr-3-gp140 (HIV89-6)	CNCM I-3058

5 I-2883 (pMV2 (EdB) gp160[delta]V3HIV89.6P) es un plásmido derivado de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus del sarampión (cepa Edmonston B), bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y que contiene el gen de la gp160ΔV3 + ELDKWAS de la cepa 89.6P del virus SHIV insertado en una ATU en la posición 2 (entre los genes N y P del virus del sarampión). El tamaño del plásmido es de 21264 nt.

10 I-2884 (pMV2 (EdB) gp160HIV89.6P) es un plásmido derivado de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus del sarampión (cepa Edmonston B), bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y que contiene el gen de la gp160 de la cepa 89.6P del virus SHIV insertado en una ATU en la posición 2 (entre los genes N y P del virus del sarampión). El tamaño del plásmido es de 21658 nt.

I-2885 (pMV2 (EdB) gp140HIV89.6P) es un plásmido derivado de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus del sarampión (cepa Edmonston B), bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y que contiene el gen de la gp140 de la cepa 89.6P del virus SHIV insertado en una ATU en la posición 2 (entre los genes N y P del virus del sarampión). El tamaño del plásmido es de 21094 nt.

15 I-2886 (pMV3 (EdB) gp140[delta]V3HIV89.6P) es un plásmido derivado de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus del sarampión (cepa Edmonston B), bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y que contiene el gen de la gp140ΔV3 (ELDKWAS) de la cepa 89.6P del virus SHIV insertado en una ATU en la posición 2 (entre los genes N y P del virus del sarampión). El tamaño del plásmido es de 21058 nt.

20 I-2887 (pMV2 (EdB) -NS1YFV17D) es un plásmido derivado de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus del sarampión (cepa Edmonston B), bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y que contiene el gen NS1 del virus de la fiebre amarilla (YFV 17D) insertado en una ATU en la posición 2 (entre los genes N y P del virus del sarampión). El tamaño del plásmido es de 20163 nt.

25 I-2888 (pMV2 (EdB) -EnvYFV17D) es un plásmido derivado de Bluescript que contiene la secuencia completa del virus del sarampión (cepa Edmonston B), bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y que contiene el gen Env del virus de la fiebre amarilla (YFV 17D) insertado en una ATU en la posición 2 (entre los genes N y P del virus del sarampión). El tamaño del plásmido es de 20505 nt.

30 I-3033 (pTM-MVSchw2-Es (WNV)) es un plásmido derivado de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus del sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y que expresa el gen de la envuelta secretada (E) del virus del Nilo occidental (WNV), insertado en una ATU.

- I-3034 (pTM-MVSchw2-GFPbis) es un plásmido derivado de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus del sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y que expresa el gen de la GFP insertado en una ATU.
- 5 I-3035 (pTM-MVSchw2-p17p24[delta]myr (HIVB)) es un plásmido derivado de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus del sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y que expresa el gen gag que codifica las proteínas p17p24Δmyr del virus HIVB insertado en una ATU.
- 10 I-3036 (pTMVSchw3-Tat (HIV89-6p)) es un plásmido derivado de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus del sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y que expresa el gen tat de la cepa viral 89.6P insertado en una ATU.
- I-3037 (pTM-MVSchw3-GFP) es un plásmido derivado de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus del sarampión (cepa Schwarz) bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y que expresa el gen de la GFP insertado en una ATU que tiene una delección de un nucleótido.
- 15 I-3038 (pTM-MVSchw2-Es) (YFV) es un plásmido derivado de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus del sarampión (cepa Schwarz) bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y que expresa el gen de la proteína secretada del virus de fiebre amarilla (YFV) insertado en una ATU.
- 20 I-3054 (pTM-MVSchw2-gp140 [delta] V1 V2 V3 (HIV89-6)) es un plásmido derivado de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus del sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y que expresa el gen que codifica gp140 [delta] V1 V2 (HIV 89-6) insertado en una ATU.
- 25 I-3055 (pTM-MVSchw2-gp140 [delta] V3 (HIV89-6)) es un plásmido derivado de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus del sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y que expresa el gen que codifica gp14 [delta] V3 (HIV 89-6) insertado en una ATU.
- I-3056 (pTM-MVSchw2-gp160 [delta] V1 V2 V3 (HIV89-6)) es un plásmido derivado de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus del sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y que expresa el gen que codifica gp160 [delta] V1 V2 V3 (HIV 89-6) insertado en una ATU.
- 30 I-3057 (pTM-MVSchw2-gp160 [delta] V1 V2 (HIV89-6)) es un plásmido derivado de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus del sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y que expresa el gen que codifica gp160 [delta] V1 V2 (HIV 89-6) insertado en una ATU.
- 35 I-3058 (pTM-MVSchw2-Gag SIV239 p17-p24 [delta] myr-3-gp140 (HIV89-6)) es un plásmido derivado de Bluescript que contiene una secuencia de ADNc del genoma infeccioso completo del virus del sarampión (cepa Schwarz), bajo el control del promotor de la ARN polimerasa T7 y que expresa el gen que codifica Gag SIV239 p17p24 [delta] myr-3-gp140 (HIV89-6) insertado en una ATU.
- En una realización particular de la invención, el replicón contenido en el vector de virus recombinante del sarampión se diseña de acuerdo con el mapa de la Figura 2 en la que « inserto » representa la secuencia heteróloga de ADN.
- 40 Cuando la secuencia heteróloga de ADN presente en el vector del virus recombinante del sarampión de la invención se obtiene del virus de la fiebre amarilla (YFV), se selecciona ventajosamente entre YFV 17D 204 comercializada por Aventis Pasteur con el nombre comercial Stamaril®.
- Cuando la secuencia heteróloga de ADN presente en el vector del virus recombinante del sarampión de la invención se obtiene del virus del Nilo occidental (WNV), se selecciona ventajosamente entre la cepa neurovirulenta IS 98-ST1.
- 45 La invención también se refiere a un sistema de recuperación para el ensamblaje del virus recombinante del sarampión que expresa una secuencia heteróloga de aminoácidos, que comprende una determinada célula auxiliar recombinada con al menos un vector adecuado para la expresión de la ARN polimerasa T7 y la expresión de las proteínas N, P y L del virus del sarampión transfectado con un vector del virus recombinante del sarampión de acuerdo con cualquiera de las definiciones proporcionadas anteriormente.
- 50 Los virus recombinantes de la invención o las VLP también pueden producirse *in vivo* mediante una vacuna viva atenuada según la invención.
- Los virus recombinantes de la invención o las VLP pueden usarse en composiciones inmunogénicas o en composiciones de vacuna, para la protección contra flavivirus, estando expresados dichos antígenos en el virus recombinante o en la VLP, como se desveló anteriormente y como se ilustra en los siguientes ejemplos.

La solicitud desvela composiciones inmunogénicas o composiciones de vacuna útiles contra el virus HIV, virus del Nilo occidental o virus de la fiebre amarilla.

5 La invención también se refiere al uso de los virus recombinantes desvelados o de las VLP, o de los vectores recombinantes, para la preparación de composiciones inmunogénicas o para la preparación de composiciones de vacuna de la invención.

La invención también se refiere a anticuerpos preparados contra dichos virus recombinantes o contra dichas VLP, especialmente a anticuerpos protectores y a anticuerpos neutralizantes. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o anticuerpos monoclonales.

10 Los virus recombinantes para su uso de acuerdo con la invención o las VLP pueden asociarse con cualquier adyuvante apropiado, o vehículo que pueda ser útil para la preparación de composiciones inmunogénicas.

La invención se refiere en particular a las siguientes realizaciones:

15 1. Virus recombinante del sarampión que expresa una secuencia heteróloga de aminoácidos de un antígeno de un flavivirus determinado, siendo dicho virus recombinante del sarampión el producto de la expresión de una secuencia de nucleótidos recombinante que comprende una molécula de ADNc que codifica el ARN antigenómico (+) de longitud completa del virus del sarampión que se origina de la cepa Schwarz, en el que dicha molécula de ADNc comprende el inserto contenido en el plásmido pTM-MVSchw depositado con el N° I-2889 en el CNCM el 12 de junio de 2002, en el que dicho inserto codifica la secuencia de nucleótidos de la hebra de ARN (+) antigenómico de longitud completa del virus del sarampión y se recombina con una secuencia heteróloga de nucleótidos que codifica dicha secuencia heteróloga de aminoácidos de dicho antígeno de dicho flavivirus determinado en un sitio de inserción de dicho ADNc en la región en la dirección 5' del gen L de dicho ADNc bajo el control de la secuencia de control de la expresión, y dicho virus recombinante del sarampión provoca una respuesta inmune humoral y/o celular protectora contra dicho flavivirus determinado o contra tanto el virus del sarampión como contra dicho flavivirus determinado.

25 2. Virus recombinante del sarampión de acuerdo con el punto 1, que es recuperado de células auxiliares transfectadas con una secuencia de nucleótidos recombinante que comprende ADNc que codifica la secuencia de nucleótidos de ARN antigenómico (+) de longitud completa del virus del sarampión, estando dicho ADNc recombinado con una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia heteróloga de aminoácidos flaviviral, y dicha secuencia de nucleótidos recombinante que cumple la regla de seis.

30 3. Virus recombinante del sarampión de acuerdo con el punto 1 o 2, en el que la secuencia de nucleótidos recombinante es del inserto contenido en el plásmido pTM-MVSchw2-gfp depositado el 12 de junio de 2002 con I-2890 (CNCM), en el que la secuencia del gen gfp está sustituida por una secuencia que codifica dicha secuencia heteróloga de aminoácidos determinada de dicho antígeno de dicho flavivirus.

4. Virus recombinante del sarampión de acuerdo con el punto 1 o 2, en el que la molécula de ADNc se selecciona entre las siguientes secuencias:

- 35
- secuencia de nucleótidos que se extiende desde el nucleótido 83 hasta el nucleótido 15977 de la fig. 11
 - secuencia de nucleótidos que se extiende desde el nucleótido 29 hasta el nucleótido 15977 de la fig. 11
 - secuencia de nucleótidos que se extiende desde el nucleótido 29 hasta el nucleótido 16202 de la fig. 11
 - secuencia de nucleótidos que se extiende desde el nucleótido 26 hasta el nucleótido 15977 de la fig. 11
 - secuencia de nucleótidos que se extiende desde el nucleótido 26 hasta el nucleótido 16202 de la fig. 11

40

 - secuencia de nucleótidos que se extiende desde el nucleótido 9 hasta el nucleótido 15977 de la fig. 11
 - secuencia de nucleótidos que se extiende desde el nucleótido 9 hasta el nucleótido 16202 de la fig. 11.

45 5. Vector de virus recombinante del sarampión que comprende un replicón que comprende (i) una molécula de ADNc que codifica el ARN (+) antigenómico de longitud completa de un virus del sarampión operativamente unido a (ii) secuencias de control de la expresión y (iii) una secuencia heteróloga de ADN que codifican una secuencia heteróloga de aminoácidos, estando dicha secuencia heteróloga de ADN clonada en dicho replicón en condiciones que permiten su expresión y teniendo dicho replicón un número total de nucleótidos que cumple la regla de seis, en el que dicha molécula de ADNc comprende una molécula de ADNc que codifica el ARN (+) antigenómico de longitud completa del virus del sarampión que se origina de la cepa Schwarz recombinada con una molécula de ADNc que codifica una secuencia heteróloga de aminoácidos, y en el que dicho virus recombinante del sarampión es preferentemente un plásmido y el ADNc que codifica el ARN (+) antigenómico de longitud completa del virus del sarampión y la secuencia de control de la expresión son de pTM-MVSchw depositada en el CNCM con el N° I-2889.

50

6. Vector de virus recombinante del sarampión de acuerdo con el punto 5, en el que la secuencia heteróloga de ADN se clona dentro de una Unidad de Transcripción Adicional (ATU) insertada en el ADNc correspondiente al ARN antígenómico del virus del sarampión, y en el que el sitio de clonación de ATU se elige preferentemente:

- en la dirección 5' del gen N del virus del sarampión, o
- entre los genes P y M del virus del sarampión, o
- entre los genes H y L del virus del sarampión.

7. Vector de virus recombinante del sarampión de acuerdo con el punto 5 o 6, en el que la secuencia heteróloga de ADN está bajo el control de la secuencia de control de la expresión elegida de forma que dicha secuencia heteróloga se exprese o no se exprese como una proteína de fusión con una de las proteínas del virus del sarampión.

8. Vector de virus recombinante del sarampión de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5 a 7, que expresa epítopes que provocan anticuerpos neutralizantes contra dicha secuencia heteróloga de aminoácidos que es de un antígeno de un flavivirus determinado.

9. Vector de virus recombinante del sarampión de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5 a 8, en el que el replicón se diseña de acuerdo con el mapa de la Figura 2 en el que « inserto » representa la secuencia de ADN heteróloga.

10. Un sistema de recuperación para el ensamblaje de virus recombinante del sarampión que expresa una secuencia heteróloga de aminoácidos, que comprende una célula determinada transfectada con un vector de virus recombinante del sarampión de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5 a 9, y una célula auxiliar determinada recombinada con al menos un vector adecuado para la expresión de ARN polimerasa T7 y expresión de las proteínas N, P y L del virus del sarampión.

11. Una composición inmunogénica o una composición de vacuna que comprende un virus recombinante del sarampión de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 4, o un vector recombinante de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 5 a 9.

12. Una composición inmunogénica de acuerdo con el punto 11, que induce protección contra partículas tipo virus heterólogas o contra proteínas de premembrana y de envuelta.

13. Una composición inmunogénica de acuerdo con el punto 11 o 12, que provoca:

- una respuesta inmune humoral y/o celular en un modelo animal susceptible al virus del sarampión; y/o
- anticuerpos neutralizantes contra la secuencia heteróloga de aminoácidos en un modelo de animal mamífero susceptible al virus del sarampión; y/o
- anticuerpos neutralizantes contra la secuencia heteróloga de aminoácidos en un mamífero.

Aparecerán diversos aspectos de la invención en los siguientes ejemplos y en los dibujos.

Leyenda de las figuras

Figura 1. Construcciones de la glicoproteína Env de HIV1. (A) Construcciones de gp160 de longitud completa y mutantes $\Delta V3$ -AAELDK-WASAA, $\Delta V1V2$ y $\Delta V1V2V3$ (de la parte superior a la inferior). Los sitios de restricción *BbsI* y *MfeI* usados para introducir la delección $\Delta V3$ en las otras construcciones están indicados. (B) Construcciones de gp140 que son iguales que gp160 excepto en que se han delecionado las regiones intracitoplasmática y transmembrana de gp41.

Figura 2A. Mapa esquemático del plásmido pTM-MV Schw. Para construir la secuencia completa, se generaron los seis fragmentos representados en la parte superior y se recombinaron paso a paso usando los sitios de restricción únicos indicados. T7 = promotor T7; hh = ribozima en cabeza de martillo; h Δ v = ribozima de la hepatitis delta (=δ); T7t = terminador de la ARN polimerasa T7.

Figura 2B. Los vectores pMV (+) con ATU que contienen un gen de la proteína fluorescente verde (GFP del inglés "green fluorescent protein") en la posición 2 y la posición 3. Los genes del MV están indicados: N (nucleoproteína), PVC (fosfoproteína y proteínas V C), M (matriz), F (fusión), H (hemaglutinina), L (polimerasa). T7: promotor de la ARN polimerasa T7; T7t: terminador de la ARN polimerasa T7; δ: ribozima del virus de la hepatitis delta (DHV); ATU: unidad de transcripción adicional.

Figura 2C. Secuencia ATU: las letras minúsculas representan secuencias adicionales (copia de la región intergénica N-P del virus del sarampión) más sitios de clonación. Las letras mayúsculas corresponden a la secuencia GFP potenciada insertada. Esta secuencia se inserta en el sitio SpeI (posición 3373) de la secuencia de ADNc de la cepa

Schwarz del virus del sarampión para ATU2 y en el sitio Spel (posición 9174) para la ATU3. La mutación que distingue ATU normal de bis (en pTM-MV Schw2-gfp y pTM-MV Schw2-GFPbis) es una C sustituida (letra mayúscula) en el extremo de ATU.

5 **Figura 3 (A):** muestra que la expresión de ENV_{HIV89.6} fue similar para los pases 2 y 5, confirmando la estabilidad de la expresión de transgenes en este sistema.

Figura 3 (B): construcción de virus del sarampión Schwarz (MV Schw) que expresa antígenos de HIV-1. (I3054 a I-3058). Expresión de antígenos de HIV en pTM-MV Schw recombinante.

10 **Fig. 3BA: Expresión de glicoproteínas de envuelta de HIV-1 en pTM-MV Schw recombinante.** Se infectaron células Vero con los diferentes virus recombinantes durante 48 h y se determinó la expresión de Env de HIV por transferencia de western. Se resolvieron 30 µg de cada lisado celular en SDS-PAGE al 4-12 %, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se sondearon con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-gp120 de HIV (Chessie, NIH). Se usó conjugado RPO anti-IgG de ratón como anticuerpo secundario y las proteínas se detectaron usando un kit de detección ECL.

Fig. 3BB:

15 **(1) Construcción del doble recombinante pTM-MV Schw2-Gag-3gp140**

20 Se han construido algunos vectores recombinantes que expresan dos antígenos heterólogos diferentes. Se obtuvieron por ligamiento de dos plásmidos pTM-MV Schw recombinantes diferentes que contenían diferentes insertos en la posición 2 y la posición 3. Se muestra el plásmido pTM-MV Schw2-Gag-3-gp140. A partir de este plásmido, se recuperó un virus recombinante que expresaba las proteínas tanto Gag como gp140 (Fig. 3B (2) transferencia de Western). Usando construcciones apropiadas de los diferentes genes heterólogos insertados, dicho MV recombinante que expresa dos proteínas virales heterólogas puede producir « partículas tipo virus » (VLP)

25 ensambladas en células infectadas y secretadas: Gag-Env de retrovirus o prM/E de flavivirus. Dichas VLP son buenos inmunógenos. Producidas *in vivo* por una vacuna viva atenuada tipo MV, deberían ser incluso más inmunogénicas.

(2) Expresión de gp140 de HIV-1 y Gag de SIV239 en pTM-MV Schw2-Gag_{SIV} recombinante (p17-p24 [delta] myr)-3-gp140_{HIV}. Se detectaron gp140 de HIV y Gag de SIV en lisados de células Vero infectadas. (A) Un anticuerpo monoclonal de ratón anti-gp120 de HIV y (B) suero de macaco infectado con SIVmac251.

30 **Figura 3C: Expresión de Gag de HIV-1 (p17-p24Δmyr) en pTM-MV Schw2-Gag_{HIV} recombinante (p17p24 [delta] myr).** Se detectó Gag de HIV en lisados de células Vero infectadas con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Gag de HIV.

35 **Figura 3D: Expresión de proteína Tat de HIV-1 en pTM-MV Schw recombinante.** Se infectaron células Vero con virus MV Schw-Tat HIV recombinante o MV Schw de control durante 48 h y se determinó la expresión de Tat de HIV por transferencia de western. Se resolvieron 30 µg de cada lisado celular en SDS-PAGE al 4-12 %, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se sondearon con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Tat de HIV (BH10, NIH). Se usó conjugado RPO anti-IgG de ratón como anticuerpo secundario y las proteínas se detectaron usando un kit de detección ECL.

40 **Figura 4. Cinética de crecimiento de virus MV_{EdB}-Env_{HIV} recombinantes en células Vero.** Se infectaron células en placas de 35 mm con virus recombinantes a diferentes MOI (indicadas). En cada momento puntual, las células se recogieron y se determinaron los títulos de virus asociados a células usando el método de DICT₅₀ en células Vero. (A) Infecciones con MV EdB-tag y diferentes virus recombinantes MV-HIV a MOI = 0,0001. (B) Infecciones con MV2-gp160_{HIV} a dos diferentes MOI (0,0001 y 0,01).

45 **Figura 5. Respuestas inmunes humorales anti-HIV y anti-MV en ratones inoculados con virus recombinantes MV_{EdB}-Env_{HIV}.** A-B Se inmunizaron cuatro grupos de 3 ratones con 10⁷ DICT₅₀ de cada virus recombinante MV-HIV. Se determinaron los títulos de anticuerpos contra MV (A) y Env de HIV (B) por ELISA en sueros recogidos 28 días después de la inoculación. C-F: Títulos de anticuerpos anti-HIV y anti-MV en ratones IFNAR^{-/-}CD46^{+/+} inmunizados con virus MV-Env_{HIV}. (C) Títulos anti-MV y anti-HIV detectados 28 días después de la inyección de dosis crecientes de MV_{EdB}-gp160 (3 ratones por grupo). (D) Títulos anti-MV (barras negras), anti-HIV (barras grises) y anti-ELDKWAS (barras blancas) detectados 28 días después de la inyección de 5 10⁶ DICT₅₀ de virus MV-Env_{HIV} (6 ratones por grupo). Los resultados se expresan como los valores medios ± DE.

55 **Figura 6. Actividades neutralizantes contra Bx08 de sueros de ratones inmunizados con virus MV2gp140_{HIV89.6} y MV2-gp160_{HIV89.6}.** Se proporcionó aislado primario Bx08 por C. Moog (Estrasburgo, Francia) y se propagó una vez en PBMC estimuladas con PHA para obtener soluciones madre virales. Se incubaron 2 ng de virus durante 30 min a 37 °C con 25 µl de cada suero de ratón (recogido un mes después de la infección) antes de la infección de células P4R5 en una placa de 96 pocillos. Las células después se cultivaron en DMEM que contenía suero de ternera fetal

al 10 % hasta 2 días después de la infección, momento en el cual se midió la actividad 1 galactosidasa con un ensayo de quimioluminiscencia (Roche, Alemania). Carril 1: suero de un ratón inmunizado con MV_{EdB-tag}; Carril 2: suero de un ratón inmunizado con MV2-gp140_{HIV-1}; Carril 3: suero de un ratón inmunizado con MV2-gp160_{HIV-1}; Carril 4: células no infectadas. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

5 **Figura 7. La vacuna candidata Edm-HIV Env estimula linfocitos específicos de env *in vivo*.** Se inocularon dos grupos de 3 ratones con 10⁷ DICT₅₀ de virus MV2-gp160_{HIV}, y se sacrificaron por eutanasia 7 días y 1 mes después de la inoculación. (A) Ensayos ELISpot realizados con esplenocitos de ratones inmunizados. Estimulación con proteína purificada HIV-gp120 (negro) o BSA irrelevante (blanco). (B) Los esplenocitos recogidos 7 días después de la inmunización se estimularon con medio solo (panel de la izquierda), gp120 de HIV (panel medio) o virus EdB-tag (panel de la derecha). La citofluorometría de tres colores detectó linfocitos tanto CD8⁺ (panel superior) como CD4⁺ (panel inferior) productores de γ -IFN después de estimulación con gp120 de HIV y virus del sarampión. Los porcentajes se san de acuerdo con las entradas totales de linfocitos CD8⁺ (panel superior) y CD4⁺ (panel inferior) respectivamente.

10 **FIG. 7C, D.** Títulos de anticuerpos anti-MV y anti-HIV en ratones y macacos inmunizados con virus MV2gp140HIV89.6 meses después de sensibilización con MV. (C) Se vacunaron ratones (3 por grupo) con 10⁵ DICT₅₀ de EdB-tag MV, después se inocularon dos veces con 5 10⁶ DICT₅₀ de virus MV2-gp140_{HIV89.6} como se indica (flechas). (D) Se vacunaron macacos cynomolgus (nº 432 y 404) con Rouvax[®], después se inocularon dos veces con 5 10⁶ DICT₅₀ de virus MV2-gp140_{HIV89.6} como se indica (flechas).

15 **Figura 8.** Representación esquemática de la unidad de transcripción adicional (ATU) y el plásmido del vector de MV Schwarz. (A) Elementos de acción en cis de la ATU insertada en la posición 2 entre las fases de lectura abierta de MV de fosfoproteína (P) y matriz (M). (B). Representación de las tres posiciones de inserción de ATU en el plásmido del vector de MV Schwarz.

20 **Figura 9.** Expresión de proteínas YFV por MV recombinante. Se infectaron células Vero por MV recombinantes EdB-Env_{YFV} y EdB-NS1_{YFV} a una MOI de 0,01. La inmunofluorescencia se realizó usando un suero de ratón policlonal anti-YFV y un anticuerpo secundario Cy3 anti-IgG de ratón. Todos los sincitios observados en células Vero infectadas fueron positivos.

25 **Figura 10.** Exposición con YFV. Se inocularon seis ratones de 4 semanas de edad con una mezcla de virus EdB-Env_{YFV} y EdB-NS1_{YFV} (10⁷ DICT₅₀) y se inocularon 6 ratones de control con la misma dosis de virus EdB-tag convencional. Después de 1 mes, se determinaron las serologías anti-MV y se observó un nivel similar de anticuerpos en los dos grupos. Se expuso a los ratones y se observó la mortalidad.

30 **Figura 11.** Secuencia completa de nucleótidos del plásmido pTM-MV Schw (CNCM I-2889). La secuencia puede describirse del siguiente modo con referencia a la posición de los nucleótidos:

- 1-8 sitio de restricción *NotI*
- 9-28 promotor T7
- 35 - 29-82 ribozima en cabeza de martillo
- 83-15976 antigenoma de MV Schwarz
- 15977-16202 ribozima del HDV y terminador T7
- 16203-16210 sitio de restricción *NotI*
- 16211-16216 sitio de restricción *ApaI*
- 40 - 16220-16226 sitio de restricción *KpnI*
- 16226-18967 plásmido pBluescript KS (+) (Stratagene)

Figura 12:

Las secuencias flavivirales que se han expresado en MV son las siguientes:

Figura 12A: sec YFV Env: Es la secuencia Env YFV 17D204 clonada por los inventores.

pos 1 a 3	codón INICIO
pos 4 a 51	péptido señal de Env
pos 52 a 1455	secuencia de Env

pos 1456 a 1458 codón PARADA

Los codones parada e inicio se han añadido.

Figura 12B: sec YFV NS1: Es la secuencia NS1 YFV 17D204 clonada por los inventores

pos 1 a 3 codón INICIO
 pos 4 a 78 péptido señal de NS1
 pos 79 a 1110 secuencia de NS1
 pos 1111 a 1113 codón PARADA

Los codones parada e inicio se han añadido.

Figura 12C: sec WNV Env: Es la secuencia Env WNV clonada por los inventores.

pos 1 a 3 codón INICIO
 pos 4 a 51 péptido señal de Env
 pos 52 a 1485 secuencia de Env
 pos 1486 a 1488 codón PARADA

5 Los codones parada e inicio se han añadido.

Figura 12D: sec WNV NS1: Es la secuencia NS1 WNV clonada por los inventores.

pos 1 a 3 codón INICIO
 pos 4 a 78 péptido señal de NS1
 pos 79 a 1104 secuencia de NS1
 pos 1105 a 1107 codón PARADA
 pos 1108 a 1110 codón PARADA (se añade un segundo para respetar la regla de seis)

Los codones parada e inicio se han añadido.

Figura 13: Representación esquemática de pTM-MV Schw-sE_{WNV} recombinante. Los genes de MV están indicados: N (nucleoproteína), PVC (fosfoproteína y proteínas V, C), M (matriz), F (fusión), H (hemaglutinina), L (polimerasa). T7: promotor de la ARN polimerasa T7; T7t: terminador de la ARN polimerasa T7; δ ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV); ATU: unidad de transcripción adicional.

10

Después de la recuperación, el virus recombinante se cultivó en monocapas de células Vero. El procedimiento usado para preparar el virus recombinante fue similar a los procedimientos convencionales usados para preparar las vacunas vivas atenuadas contra el sarampión, excepto para la liofilización que no se usó.

15 La expresión de WNV sE en células Vero infectadas por el virus MV-WN sE se verificó usando ensayo de inmunofluorescencia indirecta como se muestra en la Figura 14.

Figura 14: Expresión de la proteína sE de WNV en sincitios inducidos por MV. Detección por inmunofluorescencia de la proteína secretada Env (sE) de WNV en sincitios inducidos por MV-WN sE recombinante en células Vero. (A, B) Proteína sE detectada en la superficie externa en todas partes de los sincitios inducidos por MV recombinante. (C, D) Proteína sE intracelular en sincitios inducidos por MV recombinante.

20

Figura 15: Serología anti-MV 1 mes después de la primera inyección.

Figura 16: Secuencias inmunogénicas de HIV-1 preparadas para su inserción en el plásmido pTM-MV Schw2 ilustrado en el Ejemplo II.

Ejemplo I: Virus recombinantes del sarampión que expresan la glicoproteína de envuelta nativa de HIV1 subtipo B, o envueltas con bucles variables delecionados, inducen respuestas inmunes humorales y celulares

25

La preparación de una vacuna contra HIV con su formidable capacidad de evadir las respuestas inmunes del hospedador es ciertamente una tarea desalentadora. Sin embargo, lo que hemos aprendido acerca de la inmunopatogénesis de la infección y los resultados ya obtenidos con modelos animales indican que puede ser

posible (Mascola, J. R., y G. J. Nabel. 2001. Vaccines for prevention of HIV-1 disease. *Immunology*. 13:489-495). De forma ideal, una inmunización preventiva debería inducir 1) anticuerpos que neutralicen aislados primarios, evitando de este modo la entrada en células hospedadoras, y 2) CTL que eliminen las células que no obstante se infectaron. Los anticuerpos y CTL deberían estar dirigidos a epítopes conservados que son críticos para la entrada del virus y la replicación en células hospedadoras.

Varios estudios, en particular con diversas vacunas candidatas, muestran que una buena respuesta inmune celular podría ser capaz de controlar la carga viral, aunque no de eliminar el agente (Mascola, J. R., y G. J. Nabel. 2001. Vaccines for prevention of HIV-1 disease. *Immunology*. 13:489-495). Por otro lado, las respuestas inmunes humorales inducidas hasta ahora por vacunas de subunidad han sido decepcionantes, principalmente porque los anticuerpos inducidos no neutralizaron los aislados primarios de HIV. Por ejemplo, vacunas recombinantes que expresaba Env de SIV fueron capaces de proteger a macacos contra una exposición homóloga, pero no heteróloga (Hu, S., et al 1996. Recombinant subunit vaccines as an approach to study correlates of protection against primate lentivirus infection. *Immunology Letters*. 51:115-119). La inmunización con ADN combinada con refuerzo con gp recombinante soluble podría proteger a macacos contra una exposición heteróloga pero solamente contra una cepa de SIV genéticamente relacionada con la vacuna (Boyer, J. et al 1997. Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nature Medicine*. 3:526-532). Más recientemente, diversos regímenes « sensibilización-refuerzo », usando combinaciones de ADN desnudo y vectores virales tales como MVA (Amara, R. et al. 2001. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science*. 292:69-74) o adenovirus (Shiver, J. W., et al 2002. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature*. 415:331-335), dieron protección razonable contra una exposición con SHIV89.6P patogénico. La « sensibilización-refuerzo » podría no ser un requisito absoluto ya que el uso de vacuna atenuada viva recombinante contra el poliovirus protegió a macacos contra una exposición con SIV251 (Crotty, S., et al 2001. Protection against simian immunodeficiency virus vaginal challenge by using Sabin poliovirus vectors. *J Virol*. 75:7435-7452). Es interesante observar que en todos estos experimentos, incluso cuando los animales no estuvieron protegidos contra la infección, la inmunización causó un retardo en, o incluso anuló, la enfermedad clínica.

Como se muestra por cristalografía, los bucles V1 y V2 de gp120 enmascaran el sitio de unión a CD4 y el bucle V3 enmascara los sitios de unión para los co-receptores CXCR4 y CCR5 (Kwong, P. D., et al. 2000. Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory-adapted and primary isolates. *Structure Fold Des*. 8:1329-1339; Kwong, P. D. et al. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 393:648-659; Kwong, P. D., et al. 2000. Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Virol*. 74:1961-1972). A pesar de esto, están presentes anticuerpos contra el sitio de unión a CD4 de gp120 en los sueros de individuos seropositivos para HIV y son capaces de neutralizar varios aislados de HIV-1 en ensayos *in vitro* (Burton, D. 1997. A vaccine for HIV type 1: the antibody perspective. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:10018-10023; Hoffman, T. L. et al., 1999. Stable exposure of the coreceptor-binding site in a CD4-independent HIV-1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:6359-6364). Además, algunos epítopes que están ocultos en la estructura 3-D de la glicoproteína pero llegan a exponerse después de unirse al co-receptor, pueden inducir anticuerpos altamente neutralizantes (Muster, T., et al. 1993. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1, *J Virol*. 67:6642-6647). Además, se han obtenido anticuerpos monoclonales neutralizantes de células B de pacientes (Parren, P. W., et al. 1997. Relevance of the antibody response against human immunodeficiency virus type 1 envelope to vaccine design. *Immunol Lett*. 57:105-112). Están dirigidos a los epítopes lineales gp41 (2F5) (Muster, T., F. et al. 1993. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1, *J Virol*. 67:6642-6647), o a los epítopes conformacionales gp120 (2G12, 17b, 48db12) (Thali, M., et al. 1993. Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J Virol*. 67:3978-3988; Trkola, A., et al. 1996. Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 70:1100-1108). Usados en sinergia pueden neutralizar varios aislados primarios *in vitro* (Mascola, J. R. et al. 1997. Potent and synergistic neutralization of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 primary isolates by hyperimmune anti-HIV immunoglobulin combined with monoclonal antibodies 2F5 and 2G12, *J Virol*. 71:7198-7206) y proteger a macacos contra una exposición en la mucosa con SHIV (Baba, T. W. et al. 2000. Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG 1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat Med*. 6:200-206; Mascola, J. R., et al. 1999. Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J Virol*. 73:4009-4018; Mascola, J. R., et al. 2000. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med*. 6:207-210). Sin embargo, en personas infectadas, todos estos anticuerpos están presentes en cantidades muy bajas, diluidos en grandes cantidades de anticuerpos no neutralizantes dirigidos principalmente a los bucles V1, V2 y V3 de gp120 antigénicamente variables. Por lo tanto, es de esperar que si se pudieran inducir elevados niveles de dichos anticuerpos de neutralización cruzada podría conseguirse al menos algún grado de protección. Un objetivo principal es diseñar un vector que favorezca la producción de dichos anticuerpos neutralizantes.

Por esta razón, diseñamos por ingeniería genética gp160 (anclada) y gp140 (soluble) mutantes delecionando los bucles hipervariables V1, V2 y V3 individualmente o en combinación para exponer los epítopes conservados e

inducir anticuerpos capaces de neutralizar aislados primarios. En algunas de las construcciones, también reemplazamos el bucle V3 por la secuencia AAELDKWASAA, especialmente la secuencia ELDKWAS flanqueada en ambos lados por dos alaninas para mantener la conformación de este epítipo conservado gp41 normalmente oculto en la proteína nativa pero capaz de inducir anticuerpos neutralizantes de amplio espectro (Muster, T., F. et al. 1993. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 67:6642-6647; Binley, J. M., et al. 2000. A recombinant human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein complex stabilized by an intermolecular disulfide bond between the gp 120 and gp41 subunits is an antigenic mimic of the trimeric virion-associated structure. *J Virol.* 74:627-643; Sanders, R. W., et al. 2000. Variable-loop-deleted variants of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein can be stabilized by an intermolecular disulfide bond between the gp120 and gp41 subunits. *J Virol.* 74:5091-5100). La estructura alfa helicoidal normal de este péptido debe conservarse cuando se expone en nuestras construcciones en el extremo de un bucle V3 deletado. Estas construcciones, en las que los "señuelos inmunológicos" se han eliminado y se han expuesto los epítipos neutralizantes, deberían ser buenos candidatos para la inducción de fuertes respuestas de anticuerpos neutralizantes.

Las construcciones de gp de HIV se introdujeron en un vector de vacuna contra el sarampión porque induce títulos muy elevados (1/80.000) de anticuerpos neutralizantes anti-sarampión. (Esto es probablemente porque se replica en una gran cantidad de células de diferentes tipos.) Se puede esperar, por lo tanto, que la respuesta de anticuerpos contra las gp de HIV diseñadas por ingeniería genética también sea potente. Además, la vacuna contra el sarampión también es un potente inductor de respuestas celulares de larga duración. Las vacunas recombinantes indujeron anticuerpos de neutralización cruzada así como respuestas inmunes celulares después de una única inyección en ratones CD46^{+/+} IFN- α/β R^{-/-}. Además, indujeron respuestas inmunes contra HIV en ratones y macacos con inmunidad anti-MV preexistente.

Construcción de glicoproteínas de envuelta mutantes de HIV-1.

Las glicoproteínas de envuelta usadas en este estudio (Figura 1) se obtuvieron de SHIV89.6P, un virus quimérico de la inmunodeficiencia de simios/humana que contiene los genes *tat*, *rev*, *vpu* y *env* de HIV1 en un transgenoma SIVmac239 (Reimann, K. A., et al. 1996. A chimeric simian/human immunodeficiency virus expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate *env* causes an AIDS-like disease after *in vivo* passage in rhesus monkeys. *J Virol.* 70:6922-6928). El gen *env* se obtiene de un aislado primario citopático de HIV1, 89.6, que tiene tropismo tanto por macrófagos como por células T (Collman, R., et al. 1992. An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 66:7517-7521). La secuencia de *env* se amplificó a partir del plásmido pSHIV-KB9 (NIH) que se clonó previamente después de pases *in vivo* del virus original (Karlsson, G. B., et al. 1997. Characterization of molecularly cloned simian-human immunodeficiency viruses causing rapid CD4+ lymphocyte depletion in rhesus monkeys. *J Virol.* 71:4218-4225). La *env* de longitud completa (gp160) se amplificó por PCR (polimerasa *Pfu*) usando cebadores que contienen los sitios *BsiWI* y *BssHII* únicos para la posterior clonación en el vector del sarampión: 160E5 (5'-TATCGTACGATGAGAGTGAAGGAGAAATAT-3') y 160E3 (5'-ATAGCGCGCATCACAAGAGAGTGAGCTCAA-3'). La secuencia *env* correspondiente a la forma secretada (gp140) se amplificó usando los cebadores 160E5 y 140E3 (5'-TATGCGCGCTTATCTTATATACCACAGCCAGT-3'). Se añadieron un codón de inicio y un codón de parada en ambos extremos de los genes así como varios nucleótidos después del codón de parada para respetar la "regla de seis", que estimula que la cantidad de nucleótidos del genoma de MV debe ser un múltiplo de 6 (Calain, P., y L. Roux. 1993. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol.* 67:4822-4830; Schneider, H., et al. 1997. Recombinant measles viruses defective for RNA editing and V protein synthesis are viable in cultured cells. *Virology.* 227:314-322). Ambos fragmentos gp160 y gp140 de *env* se clonaron en el plásmido pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y se secuenciaron para comprobar que no se habían introducido mutaciones.

Se generaron mutantes con deleciones de bucles por amplificación por PCR de dos fragmentos solapantes que flanqueaban la secuencia a deletar e hibridando estos fragmentos por PCR. Para reemplazar la secuencia V3 por la secuencia AAELDKWASAA que contenía el epítipo gp41 (Muster, T., F. et al. 1993. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 67:6642-6647), se diseñaron cuatro cebadores en ambos lados de los sitios *BbsI* y *MfeI* que abarcan la secuencia V3: Δ V3A1 (5'-ATAAGACATTCAATGGATCAGGAC-3'), Δ V3A2 (5'-TGCCCATTTATCCAATTCTGCAGCATTGTTGTTGGGTCTTGTACAATT-3'), Δ V3B1 (5'-GATAAATGGGCAAGTGCTGCAAGACAAGCACATTGTAACATTGT-3') y Δ V3B2 (5'-CTACTCCTATTGGTTCAATTCTTA-3'). Las secuencias subrayadas en Δ V3A2 y Δ V3B1 corresponden al epítipo AAELDKWASAA con un solapamiento de 12 nucleótidos. Las amplificaciones por PCR con los pares de cebadores Δ V3A1/ Δ V3A2 y Δ V3B1/ Δ V3B2 produjeron dos fragmentos de 218 y 499 pb respectivamente. Después de purificación en gel, estos fragmentos se hibridaron juntos por 15 ciclos de PCR sin cebadores y se amplificaron con los cebadores Δ V3A1/ Δ V3B2. El fragmento resultante de 705 pb se clonó en el plásmido pCR2.1-TOPO y se secuenció. Después de digestión por *BbsI* y *MfeI*, se purificó el fragmento que carecía de la secuencia que codifica el bucle V3 (Δ V3-AAELDKWASAA) y se introdujo en lugar del fragmento correspondiente en la gp160 y gp140 en plásmidos pCR2.1-TOPO.

Los plásmidos resultantes se denominaron pMV2-gp160 Δ V3 y pMV2-gp140 Δ V3.

Los mutantes $\Delta V1V2$ se produjeron usando el mismo procedimiento. Se amplificaron dos fragmentos en ambos lados del bucle V1 V2 usando los siguientes cebadores: 160E5 (5'-TATCGTACCGATGAGAGTGAAGGAGAAATAT-3'), $\Delta V1V2A1$ (5'-ATTTAAAGTAACACAGAGTGGGGTAAATTT-3'), $\Delta V1V2B1$ (5'-GTTACTTTAAATGTAAACACCTCAGTCATTACACAGGCCTGT-3'), $\Delta V1V2B2$ (5'-TTGCATAAAATGCTCTCCCTGGTCCTATAG-3'). Las secuencias subrayadas en $\Delta V1V2A1$ y $\Delta V1V2B1$ corresponden a un solapamiento de 12 nucleótidos generado entre los dos fragmentos. Las amplificaciones por PCR con los pares de cebadores 160E5/ $\Delta V1V2A1$ y $\Delta V1V2B1$ / $\Delta V1V2B2$ produjeron dos fragmentos de 400 y 366 pb respectivamente. Después de purificación en gel, estos fragmentos se hibridaron juntos por ciclos de 15 PCR son cebadores y se amplificaron con los cebadores 160E5/ $\Delta V1V2B2$. El fragmento de 766 pb resultante se clonó en el plásmido pCR2.1-TOPO y se secuenció. Después de digestión con *BsiWI* (en el cebador 160E5) y *BbsI*, se purificó el fragmento que carecía de la secuencia que codifica el bucle V1V2 y se introdujo en lugar del fragmento correspondiente en la gp160 y gp140 en plásmidos pCR2.1-TOPO.

Para obtener los mutantes $\Delta V1V2V3$, se introdujo el fragmento *BsiWI*/*BbsI* que carece de la secuencia que codifica el bucle V1V2 en lugar del fragmento correspondiente en los plásmidos pCR2.1-TOPO-gp140 $\Delta V3$ y pCR2.1TOPO-gp160 $\Delta V3$.

Después de digestión con *BsiWI*/*BssHII* de los diferentes plásmidos pCR2.1-TOPO, se clonaron las secuencias nativa y mutante de gp160 y gp140 en el vector EdB-tag en la posición de ATU 2 y la posición de ATU 3 (Figura 2B). Los plásmidos resultantes se denominaron pMV2-gp160_{HIV}, pMV2-gp140_{HIV}.

Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de ternera fetal (FCS) al 5 % para células Vero (riñón de mono verde africano), o con FCS al 10 %, 1 mg/ml de G418 para células auxiliares 293-3-46 (35) y para células P4-CCR5 (Hela-CD4-CXCR4-CCR5-HIVLTR-LacZ) (12).

Recuperación de virus MV_{EdB}-Env_{HIV89.6} recombinante.

Para recuperar los virus MV_{EdB}-HIV recombinantes de los plásmidos, se usaron los diferentes plásmidos EdB-HIV Env para transfectar células auxiliares 293-3-46.

Para recuperar el virus del sarampión del ADNc de los plásmidos EdB-HIV-Env, se usó el sistema de recuperación basado en células auxiliares descrito por Radecke et al. (Radecke, F., et al. 1995. Rescue of measles viruses from cloned DNA. EMBO Journal. 14:5773-5784) y modificado por Parks et al. (Parks, C. L., et al. 1999. Enhanced measles virus cDNA rescue and gene expression after heat shock. J Virol. 73:3560-3566). Se co-transfectaron células auxiliares humanas que expresaban de forma estable la ARN polimerasa T7 y las proteínas N y P del sarampión (células 293-3-46, desveladas por Radecke et al.) usando el procedimiento de fosfato cálcico con los plásmidos EdB-HIV-Env (5 μ g) y un plásmido que expresaba el gen L de la polimerasa de MV (pEMC-La, 20 ng, desvelado por Radecke et al.). El virus se recuperó después de co-cultivo de células auxiliares 293-3-46 transfectadas a 37 °C con células Vero de primate (riñón de mono verde africano). En este caso, aparecieron sincitios sistemáticamente en todas las transfecciones después de 2 días de cocultivo.

En un experimento adicional (Fig. 3C-D), después de incubación durante una noche a 37 °C, las células se sometieron a choque térmico a 43 °C durante 3 horas en medio fresco (40). Las células sometidas a choque térmico se incubaron a 37 °C durante 2 días, después se transfirieron a una capa de células Vero confluyente al 70 % (placas Petri de 10 cm). Aparecieron sincitios en células Vero después de 2-5 días de co-cultivo. Se recogieron sincitios individuales y se transfirieron a células Vero cultivadas en pocillos de 35 mm. Las células infectadas se expandieron en matraces de 75 y 150 cm³. Cuando los sincitios alcanzaron una confluencia del 80-90 %, se rasparon las células en un pequeño volumen de OptiMEM[®] (Gibco BRL) y se congelaron y descongelaron una vez. Después de centrifugación, se almacenó el sobrenadante, que contenía virus, a -80 °C.

Expresión de glicoproteínas de HIV1 por MV recombinante.

Los virus recombinantes recuperados MV2-gp140, MV2-gp160, MV3-gp140 $\Delta V3$ y MV2-gp160 $\Delta V3$ se propagaron en células Vero y se analizó la expresión de las glicoproteínas Env de HIV por transferencia de western e inmunofluorescencia. La infección de células Vero por virus MV2 recombinantes (con la inserción de transgén en la posición 2) mostró una elevada expresión de las Env gp160 y gp140 de HIV. También se detectó la proteína Env recombinante escindida (gp120). El virus MV3 (con inserción de transgén en la posición 3) expresó niveles inferiores de transgén, como se esperaba debido al gradiente de transcripción observado en la expresión de MV. Tomados en conjunto, estos resultados indican que la glicoproteína Env de HIV1 y el mutante $\Delta V3$ se expresan de forma eficaz por los MV recombinantes.

Titulación de virus. Se determinaron los títulos de MV recombinante por un ensayo de dilución limitante de punto final en células Vero. La dosis infecciosa de cultivo tisular al 50 % (DICT₅₀) se calculó usando el método de Kärber.

Capacidad de crecimiento de los virus recombinantes MV_{EdB}-Env_{HIV89.6}.

Para analizar la capacidad de crecimiento de virus MV_{EdB}-Env_{HIV89.6}, se infectaron células Vero a diferentes MOI (0,01 y 0,0001), se incubaron a 37 °C, y se recogieron en diferentes momentos puntuales. Se determinaron los

títulos de virus asociados a células para cada muestra usando el método de DICT₅₀ en células Vero. La Figura 4 muestra que usando una MOI de 0,0001, se retardaba la cinética de crecimiento de virus MV_{EdB-EnvHIV89.6}, en comparación con MVEdB-tag convencional. Sin embargo, usando una MOI de 0,01, la producción de virus recombinantes era comparable con la de virus convencionales, y se obtenían fácilmente títulos máximos de 10⁷ DICT_{50/ml} o incluso mayores.

En particular, se infectaron monocapas de células Vero (matraces T-25) a una MOI de 0,05 con los virus recombinantes. Cuando los sincitios alcanzaron una confluencia del 80-90 %, las células se lisaron en NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH=8, NP40 al 1 %, PMSF 0,5 mM y 0,2 mg/ml de Pefabloc[®] (Interbiotech, Francia). La cromatina se retiró por centrifugación y se determinó la concentración de proteína en el sobrenadante con un ensayo de Bradford. Las proteínas (50 µg) se fraccionaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de celulosa (Amersham Pharmacia Biotech). Las transferencias se sondearon con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-gp120 de HIV (Chessie 13-39.1, NIH-AIDS Research & Reference Reagent Program) o con un anticuerpo monoclonal anti-N de MV (Chemicon, Temecula, EEUU). Se usó un conjugado anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón-peroxidasa de rábano rusticano (HRP) (Amersham) como anticuerpo secundario. La actividad peroxidasa se visualizó con un kit de detección de quimioluminiscencia potenciada (Pierce).

Inmunizaciones de ratones

Se obtuvieron ratones susceptibles a infección por MV como se ha descrito previamente (21). Se cruzaron ratones FVB transgénicos heterocigóticos para CD46 (32), el receptor para las cepas de vacuna de MV (24), con ratones 129sv IFN-α/βR^{-/-} que carecían del receptor de interferón tipo I (22). La descendencia F1 se exploró por PCR y los animales CD46^{+/-} se cruzaron de nuevo con ratones 129sv IFN-α/1R^{-/-}. Los animales IFN-α/1R^{-/-} CD46^{+/-} se seleccionaron y usaron para experimentos de inmunización. Ya se ha demostrado que el mismo tipo de ratones es susceptible a infección por MV (20,21).

Se inocularon ratones hembra CD46^{+/-}IFN-α/1R^{-/-} de seis semanas de edad por vía intraperitoneal con 10⁷ DICT₅₀ de virus recombinantes MV2-gp140, MV2-gp160, MV3-gp140ΔV3 o MV2-gp160ΔV3 preparados y titulados como se ha descrito anteriormente. Los ratones se sacrificaron por eutanasia 7 días y 1 mes después de la infección. Se recogieron los bazos y la sangre completa. Se extrajeron los esplenocitos de los bazos y se mantuvieron congelados en nitrógeno líquido hasta su uso. Se decantaron los sueros y se analizó la serología por ELISA para MV (Trinity Biotech, EEUU) y HIV (Sanofi Diagnostics, Francia).

Inmunización de monos

Se vacunaron dos macacos rhesus criados en colonia (*Macaca mulatta*) (seronegativos para el retrovirus de simios tipo D, el virus linfotrópico de células T de simios, el virus de la inmunodeficiencia de simios y MV) por vía subcutánea con 10⁴ DICT₅₀ de vacuna contra MV (Rouvax[®], Aventis Pasteur, Francia). Se reforzaron un año después por dos inyecciones de 5 10⁶ DICT₅₀ de virus recombinante MV2-gp140 realizadas a intervalos de 1 mes. Se recogieron muestras de sangre en diferentes momentos puntuales y se buscaron anticuerpos anti-MV y anti-HIV.

Respuesta inmune humoral contra virus recombinantes recuperados.

1º experimento

Las respuestas inmunes humorales contra MV y Env de HIV se analizaron por ELISA en sueros recogidos 1 mes después de la inmunización de ratones. Los títulos se determinaron por diluciones limitantes. Los resultados presentados en la Figura 5 muestran que todos los ratones vacunados respondieron al sarampión con elevados títulos de anticuerpos (1/50000 a 1/80000) y a Env de HIV con títulos entre 1/1000 y 1/5000 dependiendo de la secuencia insertada. Los títulos de anticuerpos entre MV y HIV no pueden compararse porque los ELISA usados no tienen la misma sensibilidad. El ELISA de MV (Trinity Biotech, EEUU) detectó la respuesta completa contra todas las proteínas de MV, mientras que el ELISA de HIV (Sanofi Diagnostics) detectó solamente los anticuerpos anti-Env de HIV. Se ensayó la capacidad de estos sueros de neutralizar un aislado primario de HIV subtipo B usando células indicadoras, P4R5, que expresan beta-galactosidasa cuando se infectan con HIV (células HeLa-CD4-CXCR4-CCR5-HIV LTR-LacZ). En experimentos preliminares, ensayamos sueros de ratones inmunizados con virus recombinantes MV-HIV que expresaban glicoproteínas de envuelta nativas (MV-gp160_{HIV-1} o MV_{EdB}-gp140_{HIV89.6}). Los resultados mostraron que estos sueros tenían actividad neutralizante al 70-50 % contra un aislado primario, Bx08, cuando se usaban a una dilución 1/20 (Figura 6). La actividad neutralizante de los sueros creados contra las moléculas Env diseñadas por ingeniería genética está actualmente en estudio.

2º experimento

En otro experimento (Fig. 5C-F), se recogieron sueros un mes después de la inmunización y se inactivaron por calor. Se detectaron anticuerpos anti-MV (Trinity Biotech, EEUU) y anti-Env de HIV (Sanofi Diagnostic Pasteur, Biorad, Francia) usando kits ELISA comerciales. Se usó un conjugado anti-anticuerpo de ratón-HRP (Amersham) como anticuerpo secundario. Los títulos se determinaron por diluciones limitantes y se calcularon como la dilución más elevada de suero que da dos veces la absorbencia de una dilución 1/100 de una mezcla de sueros de control. Se

usaron los mismos kits ELISA para sueros de monos macacos. Se usó un anticuerpo secundario anti-IgG de mono para detectar anticuerpos anti-HIV. Se detectaron anticuerpos anti-MV con anti-IgG humana para ser capaces de calibrar el ensayo con patrones suministrado en el kit ELISA de MV. Se expresaron en mUI/ ml. Se usó una mezcla de 5 muestras de monos negativos como control negativo. El título de anticuerpos anti-ELDKAS se determinó por ELISA usando placas NeutrAvidin® de 96 pocillos (Pierce) recubiertos con el péptido biotinilado ELDKWAS (Neosystem, 5 µg/ml en NaHCO₃ 2 M, Na₂CO₃·H₂O 2 M, pH 9,6). Se usaron sueros de ratones inmunizados con MV convencional como controles negativos. Se detectaron anticuerpos unidos a péptido con conjugado anti-anticuerpo de ratón-HRP.

Ensayos de neutralización de HIV-1. Se ensayó la sero-neutralización contra SHIV89.6p (A.M. Aubertin, Universite Louis Pasteur, Estrasburgo, H. Fleur y, Burdeos, Francia), 92US660, 92US714, 92HT593 (NIH-AIDS Research & Reference Reagent Program), y un aislado primario de subtipo A: 3253 (G. Pancino, Institut Pasteur, París). Estos virus se propagaron en PBMC humanas estimuladas con PHA como ya se ha descrito (42). Se realizaron ensayos de neutralización de HIV-1 usando la línea celular indicadora P4-CCR5 (43). Se sembraron células P4-CCR5 en placas de 96 pocillos (20.000 células por pocillo) y se incubaron a 37 °C en DMEM, FCS al 10 % durante 24 h. El medio se reemplazó por 100 µl de DMEM, FCS al 10 %, DEAE dextrano (100 µg/ml) y las células se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. El virus (0,5 o 1 ng de p24) se incubó con diluciones séricas en 50 µl de PBS a 37 °C durante 20 minutos y las mezclas virus-suero se añadieron a las células por triplicado. Después de 48 horas de incubación, se midió la actividad 1-galactosidasa usando un Ensayo de Gen Informador por Quimioluminiscencia (Roche, EEUU).

20 Respuestas inmunes celulares contra virus recombinantes recuperados.

Se ensayó la capacidad de esplenocitos de ratones vacunados de secretar α-IFN después de estimulación *in vitro* por citometría de flujo y ensayos ELISpot. Se descongelaron células de ratones inmunizados 18 h antes de los ensayos funcionales y se incubaron en medio RPMI suplementado con FCS al 10 % calentado a 56 °C (Gibco) y 10 U de rh-IL2 (Boehringer Mannheim). La viabilidad celular se evaluó por exclusión de azul de tripano.

Para realizar el ensayo ELISpot de γ-IFN, se recubrieron placas multiscreen-HA de 96 pocillos con anticuerpo de captura anti-γ-IFN de ratón (R4-6A2, Pharmingen) en solución de PBS (6 µg/ml). Después de incubación durante una noche a 4 °C, los pocillos se lavaron 4 veces con PBS. Los sitios de unión a proteína restantes se bloquearon incubando los pocillos con 100 µl de RPMI/FCS al 10 % durante 1 h a 37 °C. El medio se retiró justo antes de la adición de las suspensiones celulares (100 µl) y los agentes de estimulación (100 µl). Los esplenocitos de ratones inmunizados se sembraron en placas a 5.10⁵ células por pocillo por duplicado en RPMI. Se usó concanavalina A (5 µg/ml, Sigma) como control positivo, y RPMI/IL2 (10 U/ml) como control negativo. Las células se estimularon con 1 µg/ml de gp120 de HIV1, 1 µg/ml de albúmina sérica bovina (Sigma), o virus Edm-Tag (MOI = 1). Después de incubación durante 2 h a 37 °C para la adsorción viral, se añadió FCS calentado (10 µl) en cada pocillo (concentración final del 10 %) y las placas se incubaron durante 24-36 h a 37 °C. Para retirar las células, las placas se lavaron dos veces con PBS, 4 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % (Sigma), y 2 veces de nuevo con PBS. Para la detección, se añadió un anticuerpo biotinilado anti-γ-IFN de ratón (XMG1.2, Pharmingen) a cada pocillo (100 µl, 4 µg/ml en PBS-FCS al 0,1 %). Después de incubación durante 2 h a temperatura ambiente, las placas se lavaron 4 veces con PBS-Tween 20 al 0,1 % y dos veces con PBS. Se añadió conjugado estreptavidinafosfatasa alcalina (AP del inglés Alkaline Phosphatase) (Roche) (100 µl, dilución 1/2000 en PBS) y se incubó durante 1-2 horas a temperatura ambiente. La enzima se retiró por 4 lavados con PBS-Tween 20 al 0,1 % y 2 lavados con PBS. Las manchas después se revelaron con sustrato de color BCIP/NBT (Promega) preparado en tampón AP pH 9,5 (Tris 1 M, NaCl 1,5 M, MgCl₂ 0,05 M). Los pocillos se controlaron para la formación de manchas a simple vista: después de una incubación de 15-30 minutos, la reacción se detuvo por lavado bajo un chorro de agua corriente. Después de secar al menos durante una noche a temperatura ambiente, las manchas coloreadas se contaron usando un sistema de análisis de imágenes automatizado ELISpot Reader (Bio-Sys).

Para ensayos de citometría de flujo, se estimularon 5 10⁵ esplenocitos (diluidos en 100 µl de RPMI) en placas de 96 pocillos con fondo en V con 1 µg/ml de proteína gp120 de HIV1 (AbCys) en RPMI/IL2 (10 U/ml), o virus EdB-tag (MOI = 1) diluido en 100 µl de RPMI/IL2. Las células de control no estimuladas se incubaron con RPMI/IL2 (10 U/ml). Después de incubación durante 2 h a 37 °C para la adsorción viral, se añadieron 10 µl de FCS en cada pocillo (concentración final del 10 %) y las placas se incubaron durante una noche a 37 °C. El medio después se reemplazó por 150 µl de RPMI-FCS al 10 % que contenía 10 U de rh-IL2 y 10 µg/ml de Brefeldina A (Sigma). Las células se incubaron durante 4 horas a 37 °C, se recogieron, se tiñeron con anticuerpo anti-CD8 de ratón-APC (Pharmingen) y anticuerpo anti-CD4 de ratón-CyCr (Pharmingen) durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS-BSA (0,5 %), después se fijaron durante 5 minutos a 37 °C en CytoFix® (Pharmingen). Después del lavado, las células se resuspendieron en 100 µl de PBS-BSA (0,5 %) que contenía saponina al 0,1 % (Sigma) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo anti-γ-IFN de ratón-PE (Pharmingen). Las células se lavaron de nuevo y se analizaron las muestras usando un citómetro FACSCalibur® (Becton Dickinson). Los datos se analizaron usando el software Cell Quest.

MV recombinante expresa glicoproteínas Env de HIV89.6 y se replica de forma eficaz.

Las formas anclada (gp160) y soluble (gp140) de la glicoproteína Env de HIV (cepa SHIV89.6p), con o sin delección del bucle V3 e inserción de un epítipo adicional ELDKWAS, se insertaron en una de las ATU del vector p (+) MV (Fig. 2). Se obtuvieron los virus recombinantes MV2-gp140, MV2-gp160, MV3-gp140ΔV3 y MV2-gp160ΔV3 después de la transfección de los plásmidos en la línea de células auxiliares 293-3-46 y la propagación en células Vero. MV2- y MV3- se refiere al sitio de inserción, posición 2 o 3 respectivamente, de la construcción Env_{HIV89.6}. La expresión de la proteína Env_{HIV89.6} se analizó por transferencia de western de lisados de células infectadas (Fig. 3) e inmunofluorescencia (no mostrado). Los virus MV2-gp140 y MV2-gp160 mostraron un elevado nivel de expresión de la proteína Env_{HIV89.6} (Fig. 3C, carriles 1, 2, 4). Como se esperaba, los virus MV2-gp160Δ expresaron el precursor env gp160 así como la proteína escindida gp120 (Fig. 3C, carriles 2, 4). En contraste, los virus MV2gp140 y MV3-gp140ΔV3 expresaron solamente la forma secretada y escindida gp140. El virus MV3-gp140ΔV3 expresó niveles ligeramente inferiores de transgén que los virus de la serie MV2, como se esperaba, debido al gradiente de transcripción observado en la expresión de MV (Fig. 3C, carril 3). Tomados en conjunto, estos resultados indican que Env_{HIV89.6} y los mutantes ΔV3 se expresaron de forma eficaz y maduraron correctamente. El MV recombinante se pasó 5 veces en células Vero y se comparó la expresión del transgén con la de la nucleoproteína de MV. La Figura 3 muestra que la expresión de Env_{HIV89.6} fue similar para los pases 2 y 5, lo que confirma la estabilidad de la expresión de transgenes en este sistema.

Se analizó el crecimiento de virus recombinantes MV-Env_{HIV89.6} en células Vero usando una MOI de 0,0001 o 0,01. El crecimiento de los virus recombinantes estuvo sólo ligeramente retardado en comparación con el de MV EdB-tag convencional recuperado de p+ (MV). Los virus que expresaba la gp140 secretada estuvieron menos afectados que los virus que expresaban la gp160 anclada. El recombinante gp140ΔV3 creció a la misma velocidad que el MV de control. El retardo observado con virus que expresaba la gp160 anclada puede deberse a una inferior tasa de replicación, a causa del mayor tamaño del transgén, o a una gemación reducida de MV a causa de la inserción de gp160 en la superficie de las células infectadas. No obstante, el rendimiento final de los virus recombinantes fue comparable con el de MV de control y se obtuvieron títulos máximos de aproximadamente 10⁶ a 10⁷ DICT₅₀/ml de forma rutinaria.

Inducción de respuesta inmune humoral contra MV recombinante en ratones susceptibles.

Se ensayó la inmunogenicidad de virus MV-Env_{HIV89.6} en ratones modificados genéticamente que expresaban el receptor de MV para CD46 humana y que carecían del receptor de IFN tipo I. Se ensayaron dosis crecientes de virus MV2-gp160 (10³-10⁷ DICT₅₀) en 5 grupos de 3 ratones. Se buscaron anticuerpos contra MV y Env de HIV por ELISA en sueros recogidos 1 mes después de la inmunización (Fig. 5C). Los títulos de anticuerpos tanto anti-MV como anti-HIV aumentaron cuando aumentaba la dosis de MV recombinante. Como se obtuvieron elevados títulos anti-MV cuando los animales se inocularon con 10⁶ a 10⁷ DICT₅₀, los ratones se inmunizaron con 5.10⁶ DICT₅₀ en todos los demás experimentos. A esta dosis, los títulos de anticuerpos anti-MV eran seis veces mayores que los anticuerpos anti-HIV. Hay que tener en mente que la inmunización fue contra Env de HIV solamente, mientras que se expresaron todas las proteínas de MV durante la infección. Para comparar la inmunogenicidad de las diferentes construcciones EnvHIV, se inocularon cuatro grupos de 6 ratones por vía intraperitoneal con diversos virus MV-Env_{HIV89.6} (fig. 5B, 5E). Todos los ratones respondieron contra MV (título medio anti-MV: 5 10⁴) y contra Env de HIV (título medio anti-HIV: 8 10³). No se observaron diferencias en los títulos anti-MV o anti-HIV o anti-HIV entre las cuatro construcciones ensayadas. De forma interesante, la expresión a partir de la posición de ATU 2 o ATU 3 del vector de MV no afectó a la respuesta de anticuerpos. Como las construcciones ΔV3 expresaban un epítipo adicional ELDKWAS, la respuesta de anticuerpos contra este epítipo gp41 se examinó por separado usando un ensayo ELISA específico (Fig. 5F). Los resultados mostraron que las construcciones ΔV3-ELDKWAS indujeron títulos mayores de anticuerpos anti-ELDKWAS. El título de 1/50.000 corresponde a la dilución de un suero inmune capaz de reconocer el antígeno administrado para la inmunización, en ensayo ELISA.

Virus MV-Env_{HIV89.6} inducen anticuerpos neutralizantes anti-HIV.

Se ensayó la capacidad de estos sueros de neutralizar el virus homólogo SHIV89.6p o diversos aislados primarios heterólogos de HIV-1 usando un ensayo de infectividad viral de un único ciclo en células indicadoras P4-CCR5 (43). Las células P4-CCR5 expresan los receptores de HIV-1 para CD4, CXCR4 y CCR5 y se han transfectado de forma estable con un HIV LTR LacZ. Por lo tanto, son susceptibles a los aislados de HIV-1 y expresan 1-galactosidasa después de infección. El ensayo de seroneutralización se validó usando una combinación de anticuerpo anti-inmoglobulina de HIV (HIVIG) y anticuerpos monoclonales (2F5 y 2G12) que previamente demostraron neutralizar de forma sinérgica aislados primarios de HIV (17). También usamos sueros de pacientes infectados que neutralizan aislados primarios de HIV (17). También usamos sueros de pacientes infectados que neutralizan aislados primarios de HIV usando un ensayo de neutralización convencional sobre PBMC humanas (42). La actividad neutralizante de un suero (Tabla 1) se expresa como la proporción de la reducción de infección obtenida con este suero sobre la reducción obtenida con sueros de control negativo usados a la misma dilución (sueros de individuos negativos para HIV y de pacientes infectados neutralizaron virus de subtipo B y A igual de bien en este ensayo).

Como se muestra en la Tabla 1, los anticuerpos inducidos en ratones por los cuatro virus MV-Env_{HIV89.6} neutralizaron el SHIV89.6p homólogo a las dos diluciones ensayadas (1/30 y 1/60). No se observaron diferencias significativas

5 entre los sueros obtenidos con las diferentes construcciones de Env, lo que indica que la forma secretada y anclada de la glicoproteína de HIV inducía anticuerpos neutralizantes contra el virus homólogo igual de bien cuando se expresa por MV. La delección del bucle V3, que se sabe que contiene epítopes neutralizantes específicos de tipo, no tuvo efecto significativo sobre la inducción de anticuerpos que neutralizaban el virus homólogo. Esto sugiere que la delección podría haberse compensado por la adición de un segundo epítope neutralizante ELDKWAS gp41, o por la revelación de otros epítopes neutralizantes.

10 Los anticuerpos inducidos por los virus recombinantes neutralizaron aislados primarios heterólogos subtipo B, excepto el aislado 92HT593, así como un virus subtipo A. En cada caso, los anticuerpos inducidos por la gp160 anclada fueron ligeramente más neutralizantes que los anticuerpos inducidos por la gp140 secretada, especialmente contra el virus subtipo A 3253. Los anticuerpos inducidos por la Env_{HIV89.6} ΔV3-ELDKWAS neutralizaron virus heterólogos de forma más eficaz que los inducidos por la envuelta nativa. Esto fue particularmente sorprendente para el virus Bx08 que pudo neutralizarse hasta un 90 % por sueros de ratones inmunizados con MV2-gp160ΔV3 (dilución 1/30) pero no por sueros de ratones inmunizados con MV que expresaban la Env_{HIV89.6} nativa. Esta neutralización fue exactamente tan eficaz como la neutralización por sueros de control positivo. Estos resultados muestran que remplazar el bucle V3 de Env_{HIV89.6} por un epítope adicional ELDKWAS gp41 y expresar la construcción con un vector de MV permitió la inducción de anticuerpos con actividad neutralizante cruzada contra aislados primarios de HIV-1 subtipos A y B, al menos en el contexto de infección con MV recombinante de ratones.

Tabla 1. Neutralización de aislados heterólogos primarios de HIV-1 por sueros de ratones inmunizados con MV-EnV_{HIV89.6a}.

Aislado de virus (subtipo)	Sueros de ratones (1/60)				Sueros de ratones (1/30)				Controles positivos	
	MV2 Gp140	MV2 Gp140 ΔV3	MV2 Gp160	MV2 Gp160 ΔV3	MV2 Gp140	MV2 Gp140 ΔV3	MV2 Gp160	MV2 Gp160 ΔV3	Mab	sueros de HIV humanos ^c
SHIV 89.6	40	50	52	45	76	57	72	68	ND	ND
Bx08 (B)	0	31	0	40	0	76	18	90	94	94
92 US 660 (B)	2,5	15	13	17	ND	ND	ND	ND	ND	ND
92 US 714 (B)	45	49	45	68	ND	ND	ND	ND	ND	ND
92 HT 593 (B)	0	0	0	0	0	0	0	0	ND	ND
3253 (A)	0	0	18	30	0	10	43	49	73	54

^a El suero se evaluó para anticuerpos neutralizantes a dos diluciones. Los valores son el % de reducción en la infección de aislados primarios de HIV en células P4-CCR5 en presencia de sueros de ratones (tres ratones por punto). Las determinaciones se hicieron por triplicado y las desviaciones típicas fueron <10 %.

^b Mezcla de HIVIG (2,5 mg/ml) y Mab 2F5 y 2G12 (25 µg/ml).

^c Los números corresponden a la nomenclatura usada en Burren et al.

Inducción de respuesta inmune celular contra MV recombinante

Los resultados de estos experimentos realizados con esplenocitos de ratones inmunizados con virus MV2-gp160_{HIV} (Figura 7) demostraron que una única inmunización con virus MV2-gp160_{HIV} fue capaz de sensibilizar linfocitos específicos de Env de HIV *in vivo*. El ensayo ELISpot de γ -IFN es un método sensible para el recuento de células específicas de antígeno en células frescas después de inmunización *in vivo*. Este ensayo se usó para determinar si podía detectarse células secretoras de γ -IFN específicas de Env de HIV después de una única inmunización con el virus MV2-gp160_{HIV}. La Figura 7A muestra que estaba presente una cantidad significativa de células específicas de Env en 2/3 de los ratones ensayados, 7 días así como 1 mes después de la inmunización. (Para un ratón en cada grupo la cantidad de manchas fue la misma después de estimulación con BSA o gp120). La cantidad de manchas específicas de HIV detectadas (hasta 600/10⁶ células) representa el 15-20 % de las manchas específicas de MV detectadas en los mismos ratones (no mostrado), lo que indica que el MV recombinante es capaz de inmunizar de forma eficaz contra el gen foráneo expresado.

Para evaluar el fenotipo de estas células específicas de Env, se realizaron experimentos de citofluorometría de 3 colores en ratones sacrificados por eutanasia 7 días después de la inmunización, en un máximo teórico de proliferación de células efectoras. Se muestra un resultado representativo en la Figura 7B. En nivel de fondo y de producción de γ -IFN para linfocitos tanto CD4+ como CD8+ se muestra en el panel de la izquierda. Para este animal, el 0,09 % de los linfocitos CD8+ (media calculada para 3 ratones: 0,31 %) y el 0,25 % de los linfocitos CD4+ (media: 0,41 %) eran espontáneamente productores de γ -IFN. Las frecuencias de células T contra HIV-gp120 (panel medio) en los subconjuntos CD8+ y CD4+ fueron del 1,76 % (media: 1,69 %) y el 0,92 % (media: 0,76 %) respectivamente. Es interesante tener en cuenta que en el mismo ratón inmunizado, las frecuencias de células específicas del sarampión en los subconjuntos CD8+ y CD4+ fueron del 7,63 % (media: 7,03 %) y el 4,11 % (media: 3,50 %) respectivamente. De hecho, el virus recombinante MV2-gp160_{HIV} expresa 6 proteínas del sarampión más una proteína foránea gp160. Por tanto, las frecuencias de linfocitos específicos de antígeno siguieron las proporciones de genes recombinantes. Como conclusión, la citofluorometría de 3 colores realizada 7 días después de la vacunación con virus MV2-gp160_{HIV} mostró que se sensibilizaban linfocitos tanto CD8+ (Fig. 7B, panel superior) como CD4+ (Fig. 7B, panel inferior) específicos de gp120 de HIV y virus del sarampión *in vivo*.

Inducción de una respuesta anti-HIV en animales con inmunidad anti-MV preexistente.

Primero ensayamos la posibilidad de reforzar la respuesta anti-HIV por una segunda inyección de MV recombinante. Los ratones inmunizados con 5.10⁶ DICT₅₀ de virus recombinante MV2-gp140 (3 ratones por grupo) se reforzaron con una segunda inyección del mismo MV recombinante un mes después de la primera inyección. Los títulos medios de anticuerpos anti-MV y anti-HIV en el momento del refuerzo eran de 5 10⁴ y 8 10³ respectivamente. Estos títulos aumentaron hasta, respectivamente, 5 10⁵ y 5 10⁴ un mes después del refuerzo. Por tanto, las respuestas anti-MV y HIV pueden reforzarse 10 veces inyectando la misma dosis de MV recombinante un mes después de la primera inmunización.

Después ensayamos la capacidad de MV recombinante de inducir anticuerpos anti-HIV en ratones y monos en presencia de inmunidad anti-MV preexistente. Primero se inmunizaron ratones (3 ratones por punto) con 10⁵ DICT₅₀ de EdB-tag MV (sin un inserto de HIV). Se indujeron elevados niveles de anticuerpos anti-MV (Fig. 7C). El título disminuyó ligeramente después de 2 meses y permaneció estable durante los siguientes 9 meses. Los ratones después se inocularon con 5 10⁶ DICT₅₀ de MV2-gp140_{HIV89.6}, y se reforzaron con la misma dosis un mes después. El título de anticuerpos anti-MV se aumentó 100 veces y se indujeron elevados títulos de anticuerpos anti-HIV (5 10⁴). Estos títulos fueron similares a los obtenidos después de la inmunización de animales vírgenes con dos inyecciones.

Se realizó el mismo experimento con macacos rhesus (Fig. 7D). Se inmunizaron dos macacos con una dosis convencional (10⁴ DICT₅₀) de vacuna contra MV (Rouvax[®], Aventis Pasteur). Como para los ratones, se indujeron elevados niveles de anticuerpos anti-MV y permanecieron estables durante un año. Los macacos después se inocularon con 5 10⁶ DICT₅₀ de MV2-gp140_{HIV89.6} dos veces a intervalos de un mes. Los títulos anti-MV aumentaron 150 veces después de la primera inyección de MV-HIV, mientras que la segunda inyección tuvo ninguno o poco efecto. Se indujeron anticuerpos anti-HIV por la primera inyección con MV2-gp140_{HIV89.6} a pesar de la presencia de inmunidad anti-MV preexistente. Un mes después de la segunda inyección con MV2-gp140_{HIV89.6}, el nivel de anticuerpos anti-HIV había aumentado aproximadamente 10 veces y había alcanzado títulos similares a los obtenidos en ratones. Este nivel permaneció estable durante los siguientes 5 meses.

El objetivo principal del presente trabajo fue ensayar la inmunogenicidad de virus recombinantes MV-Env_{HIV} atenuados. Demostramos que dichos recombinantes eran genéticamente estables, expresaban la proteína Env de HIV a elevados niveles, e inducían elevados títulos de anticuerpos contra construcciones tanto de MV como de Env de HIV en ratones transgénicos. Los títulos de anticuerpos anti-HIV fueron aproximadamente el 15-20 % de los de anticuerpos anti-MV. Esto corresponde aproximadamente a la proporción de proteínas HIV/MV expresadas por los virus recombinantes. Las construcciones de Env de HIV con un bucle V3 delecionado y un epítotope adicional ELDKWAS gp41 indujeron dos veces tantos anticuerpos anti-ELDKWAS como construcciones nativas, lo que sugiere que la confirmación nativa del péptido adicional se conservaba a pesar de su posición ectópica. También se

indujo un elevado nivel de células CD8+ y CD4+ específicas de HIV. Hasta el 1,5-2 % de las células T CD8+ totales y el 0,9 % de las células T CD4+ totales fueron específicas de HIV.

Sin embargo, el aspecto más importante de nuestros resultados es que estos anticuerpos anti-HIV fueron neutralizantes para el virus homólogo SHIV89.6p así como para varios aislados primarios heterólogos de HIV-1 de subtipo A y subtipo B. De forma interesante, la construcción de gp160 anclada $\Delta V3$ -ELDKWAS indujo anticuerpos que neutralizaron virus heterólogos de forma más eficaz que los inducidos por la envuelta nativa. Sus títulos neutralizantes fueron similares a los de sueros humanos neutralizantes de HIV. La capacidad neutralizante más amplia de estos anticuerpos podría deberse a la adición de un segundo epítipo neutralizante ELDKWAS gp41, o a la exposición de epítopos neutralizantes conservados previamente enmascarados. Varios grupos han insertado el epítipo ELDKWAS en diversas moléculas inmunogénicas (44, 45, 46, 47). Estos estudios demostraron que el contexto conformacional en que se presenta el epítipo es esencial para la inducción de anticuerpos neutralizantes. Se demostró que una restricción tipo giro 1 es la estructura conformacional más probable del epítipo ELDKWAS reconocido por el anticuerpo neutralizante 2F5 (46). En nuestras construcciones, la inserción del corto epítipo AAELDKWASAA en lugar del bucle V3, que está flanqueado por cadenas 1 (28, 29), puede tener dicha confirmación tipo giro 1.

Ya se ha demostrado que la delección de bucles hipervariables de Env de HIV puede potenciar su inmunogenicidad (3, 48, 39). Sin embargo, en estudios previos se obtuvieron anticuerpos neutralizantes solamente después de múltiples inyecciones de elevadas cantidades de proteína soluble (23), o con un régimen de "sensibilización-refuerzo" usando cantidades muy grandes de ADN y proteína pura (3, 39). En contraste, observamos los mismos niveles de anticuerpos neutralizantes en ratones inyectados con una única dosis de MV-gp160 $\Delta V3$ -ELDKWAS. La buena inmunogenicidad en nuestro sistema probablemente resulta del hecho de que la Env de HIV se expresa y procesa por el sistema inmune del mismo modo que proteínas de la vacuna viva de MV, un inmunógeno altamente potente. Puede esperarse que dichos niveles de anticuerpos neutralizantes pudieran al menos inducir protección parcial en individuos vacunados. De acuerdo con los datos de otros (3, 39), podría ser posible aumentar la inmunogenicidad de recombinantes M-HIV Env incluso más delecionando los bucles V1 y V2 de gp120 de HIV, especialmente para inducir anticuerpos dirigidos contra el sitio de unión a CD4. Sin embargo, recientemente se ha informado de que este sitio de unión a receptor puede escapar de la respuesta inmune por enmascaramiento conformacional y antrópico (49).

La presencia de inmunidad anti-MV en casi toda la población humana adulta parecería restringir el uso de recombinantes MV a bebés, un objetivo ya meritorio en cualquier caso. Sin embargo, varios estudios demostraron que la revacunación de individuos ya inmunizados produjo un refuerzo de anticuerpos anti-MV, lo que sugiere que la vacuna viva atenuada replicaba y expresaba sus proteínas a pesar de la inmunidad preexistente (50). En dichas circunstancias, podría esperarse ser capaces de vacunar a adultos contra un antígeno foráneo con un MV recombinante. De hecho, nuestros resultados demuestran, tanto con ratones como con macacos, que pueden obtenerse elevados niveles de anticuerpos neutralizantes anti-HIV en presencia de inmunidad preexistente anti-MV.

Diversos regímenes de "sensibilización-refuerzo", usando combinaciones de ADN desnudo y vectores virales tales como un sMVA (1) o Adenovirus (29), dieron protección razonable contra una exposición con SHIV89.6p patogénico. En el presente estudio, demostramos que una única inyección de MV es capaz de combinar respuestas humorales y celulares a niveles similares a los inducidos por estas combinaciones complejas.

Los mismos recombinantes se han preparado usando la cepa clonada Schwarz como vector. Esto aumentaría su inmunogenicidad incluso más.

Ejemplo II: Construcción de virus del sarampión Schwarz (MVSchw) que expresan antígenos de HIV-1

Para ensayar su capacidad como candidatos de vacuna contra infección por HIV, construimos varios virus recombinantes del sarampión (MV) Schwarz que expresaban antígenos de HIV-1. Se construyeron diferentes genes de HIV-1 a partir de diferentes fases de lectura abierta y se introdujeron en unidades de transcripción adicionales en el ADNc de MV Schwarz que se había clonado previamente (pTM-MVSchw). Después de recuperar los diferentes virus recombinantes del sarampión Schwarz, se analizó la expresión de las diferentes proteínas de HIV-1 por transferencia de western de lisados de células infectadas (Fig. 3A-D).

Se construyeron diferentes inmunógenos a partir de la glicoproteína Env (a partir de ahora 1-8), la proteína Gag (a partir de ahora 9), y la proteína Tat (a partir de ahora 10) de HIV-1:

1. Glicoproteína gp140 de HIV-1 89.6p
2. Glicoproteína anclada gp160 de HIV-1 89.6p
3. Glicoproteína secretada gp140 de HIV-1 89.6p delecionada de la región hipervariable V3 y epítipo adicional AAELDKWASAA (gp140HIV_{89.6} $\Delta V3$ -ELDKWAS)
4. Glicoproteína anclada gp160 de HIV-1 89.6p delecionada de la región hipervariable V3 con un epítipo adicional AAELDKWASAA (gp160HIV_{89.6} $\Delta V3$ -ELDKWAS)

5. Glicoproteína secretada gp140 de HIV-1 89.6p delecionada de las regiones hipervariables V1-V2 (gp140HIV_{89.6}ΔV1V2)
6. Glicoproteína anclada gp160 de HIV-1 89.6p delecionada de las regiones hipervariables V1-V2 (gp160HIV_{89.6}ΔV1V2)
- 5 7. Glicoproteína secretada gp140 de HIV-1 89.6p delecionada de las regiones hipervariables V1-V2-V3 (gp140HIV_{89.6}ΔV1V2V3)
8. Glicoproteína anclada gp160 de HIV-1 89.6p delecionada de las regiones hipervariables V1-V2-V3 (gp160HIV_{89.6}ΔV1V2V3)
- 10 9. Poliproteína Gag (p17p24, delta myr) de HIV-1 (subtipo B consenso) truncada de la ORF de la nucleoproteína en el extremo C-terminal (p17p24ΔmyrHIV-1B)
10. Proteína Tat de HIV-1 89.6p (TatHIV_{89.6})

Los genes *env* de HIV que codifican las diferentes formas de la proteína Env se generaron por amplificación por PCR a partir del plásmido pSHIV-KB9 (NIH-AIDS Research & Reference Reagent Program). Las secuencias específicas se amplificaron usando la ADN polimerasa *Pfu Turbo* (Stratagene) y cebadores específicos. Para generar las diferentes deleciones, se generaron fragmentos solapantes que flanqueaban las secuencias a deleccionar y se hibridaron juntas por PCR. Después se introdujeron por clonación con enzimas de restricción en lugar del fragmento correspondiente en las secuencias de gp160 y gp140 ya clonadas en plásmidos pCR2.1-TOPO (Fig. 1A). Las diferentes secuencias generadas incluyen un codón de inicio y un codón de parada en ambos extremos y respetan la "regla de seis", que estipula que la cantidad de nucleótidos del genoma de MV debe ser divisible por 6 (7, 8). Después de digestión con *BsWI/BssHII*, se introdujeron las diferentes secuencias de HIV en el vector pTM-MV Schw en la posición de ATU 2 o 3 (Fig. 1B). Los plásmidos resultantes se denominaron:

1. pTM-MV Schw2-gp140_{HIV}
2. pTM-MV Schw2-gp160_{HIV}
3. pTM-MV Schw2-gp140ΔV3_{HIV}
- 25 4. pTM-MV Schw2-gp160ΔV3_{HIV}
5. pTM-MV Schw2-gp140_{HIV} ΔV1V2
6. pTM-MV Schw2-gp160_{HIV} ΔV1V2
7. pTM-MV Schw2-gp140_{HIV} ΔV1V2V3
8. pTM-MV Schw2-gp160_{HIV} ΔV1V2V3
- 30 9. pTM-MV Schw2-Gag_{HIV} (p17-p24 Δmyr)
10. pTM-MV Schw3-Tat_{HIV}

Se produjo un virus recombinante que expresaba tanto Gag como gp140 en ambas posiciones 1 y 2 del vector Schwarz del sarampión.

11. pTM-MV Schw2-Gag_{SIV239} (p17-p24 Δmyr)-3-gp140_{HIV}

35 Este virus expresaba ambas proteínas (Fig. 3B(1)). Dichas construcciones permiten la producción de "partículas tipo virus" de Gag-Env ensambladas de HIV, SHIV o SIV en células infectadas por virus recombinante del sarampión.

Se han generado las secuencias inmunogénicas de HIV-1 representadas en la figura 16:

Ejemplo III: Virus recombinantes del sarampión que expresan diferentes transgenes virales

40 Para demostrar las capacidades inmunizantes y protectoras de MV como vector pediátrico de vacunación, se construyó y estudió una serie de virus recombinantes del sarampión que expresaban diferentes transgenes virales (enumerados a continuación) a partir de otros virus. Los resultados presentados aquí se obtuvieron con el antiguo vector EdB-tag. Sin embargo, los presentes inventores han demostrado que EdB-tag era 100 veces menos inmunogénico que la vacuna Schwarz. Por tanto, se inocularon virus recombinantes MV_{EdB} a dosis más elevadas. Todas las secuencias insertadas con buenos registros inmunológicos pueden insertarse obviamente en el vector Schwarz.

45 Genes virales que ya se han insertado en los virus recombinantes del sarampión:

HIV subtipo B89.6P	gp160	gp140
	gp160ΔV3	gp140ΔV3
	gp160ΔV1V2	gp140ΔV1V2
	gp160ΔV1V2V3	gp140ΔV1V2V3
	tat	
Gag de codones optimizados consenso de HIV subtipo B (p17-p24)		
SIV Mac 239		Nef
		NefΔMyr
		Nef29-236
		Tat
HTLV-I		Env
		Gag (p19-p24)
		Tax

Ejemplo IV: Virus recombinantes del sarampión que expresan Env y NS1 del virus de la fiebre amarilla tienen capacidad inmune

Como una vacuna bivalente pediátrica contra el sarampión y la fiebre amarilla debe ser útil, construimos MV recombinante que expresaba las proteínas Env y NS1 del virus de la fiebre amarilla (YFV 17D204, cepa de vacuna Pasteur) y ensayamos su capacidad de proteger a ratones contra una exposición letal con YFV.

Construcción de plásmidos recombinantes MV-YFV.

El gen *env* se amplificó por PCR con la polimerasa *Pfu* usando cebadores que contienen sitios *BsiWI* y *BssHII* únicos para la posterior clonación en vector de MV: MV-YFVEnv5 (5'-TATCGTACGATGCGAGTCGTGATTGCCCTACTG-3') y MV-YFVEnv3 (5'-ATAGCGCGCTTATGTGTTGATGCCAACCCTA-3'). La proteína Env generada de este modo (aminoácidos 270-753 en la poliproteína de YFV) contenía el péptido señal en el extremo N-terminal y una parte de la región transmembrana en el extremo C-terminal. La secuencia de *NS1* se amplificó por PCR del mismo modo con la polimerasa *Pfu* usando los cebadores: MVYFVNS5 (5'-TATCGTACGATGAGAAACATGACAATGTCC-3') y MVYFVNS3 (5'-ATAGCGCGCTTAATGGCTTTCATGCGTTTTCC-3'). La proteína NS1 (aminoácidos 7541122 en la poliproteína de YFV) contenía su secuencia del péptido señal. Se añadieron un codón de inicio y uno de parada en ambos extremos de los genes así como varios nucleótidos después del codón de parada para respetar la "regla de seis", que estipula que la cantidad de nucleótidos del genoma de MV debe ser un múltiplo de 6 (7). Ambos fragmentos *env* y *NS1* se clonaron en el plásmido pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y se secuenciaron para comprobar que no se habían introducido mutaciones. Después de digestión con *BsiWI/BssHII* de los plásmidos pCR2.1-TOPO, se clonaron las secuencias de *env* y *NS1* en el vector EdB-tag en la posición ATU 2 dando los plásmidos: EdB-Env_{YFV} y EdB-NS1_{YFV}.

Recuperación de los virus EdB-Env_{YFV} y EdB-NS1_{YFV} recombinantes.

Se usaron los plásmidos EdB-Env_{YFV} y EdB-NS1_{YFV} para transfectar células auxiliares 293-3-46 como se ha descrito anteriormente, y los virus recombinantes se recuperaron de las células transfectadas co-cultivadas con célula Vero. Los virus recombinantes se pasaron dos veces en células Vero y se ensayaron para la expresión de transgenes.

Expresión de proteínas de YFV por MV recombinante.

Los virus recombinantes recuperados MV2-Env_{YFV} y MV2-NS1_{YFV} se propagaron en células Vero y se analizó la expresión de proteínas de YFV por inmunofluorescencia. La Figura 9 muestra que sincitios de células Vero infectadas por virus recombinantes MV2-YFV mostraron una elevada expresión de las proteínas Env y NS1 de YFV detectadas con un suero policlonal de ratón anti-YFV. Para determinar si la expresión de los genes de YFV era estable, los virus recombinantes recuperados se pasaron en serie en células Vero. Después de 10 pases, todos los sincitios observados en células infectadas eran positivos para YFV (no mostrado). Tomados en conjunto, estos resultados indican que las proteínas Env y NS1 de YFV se expresan de forma eficaz y estable durante varios pases por los MV recombinantes.

Inmunización de ratones con virus recombinantes MV-YFV.

Se inoculó una mezcla de ambos virus MV2-Env_{YFV} and MV2-NS1_{YFV} (10^7 DICT₅₀) por vía intraperitoneal a seis ratones CD46^{+/-} IFN- α / β R^{-/-} como se ha descrito anteriormente (véanse los experimentos de MV-HIV gp). Como control, otros seis ratones recibieron la misma dosis de vacuna convencional contra el sarampión. Después de un mes, los ratones se expusieron por vía intracraneal con YFV 17D204 (10 DL₅₀ determinada en ratones FVB). La Figura 10 muestra que el 65 % de los animales inmunizados con MV-YFV estuvieron completamente protegidos contra la exposición, mientras que todos los animales vacunados con MV convencional murieron entre 6 y 7 días después de la exposición. Además, se observó un retardo de 4 días en la mortalidad en ratones inmunizados con MV-YFV, y estos ratones no murieron con los mismos síntomas clínicos encefálicos que los ratones vacunados con la vacuna convencional contra MV. La enfermedad se atenuó y constó de parálisis de las extremidades. Debe apreciarse que los ratones IFN- α /1R^{-/-} son mucho más sensibles a infecciones virales que ratones inmunocompetentes (10^2 - 10^4 veces). Por esta razón, la dosis letal determinada en ratones inmunocompetentes fue probablemente demasiado elevada para ratones IFN- α /1R^{-/-}. El mismo experimento está en marcha usando varias dosis decrecientes de virus de exposición YFV.

En conclusión, este experimento preliminar muestra que las respuestas inmunes inducidas por MV recombinante contra proteínas de YFV son capaces de proteger a ratones contra una exposición letal.

Las construcciones anteriores se crearon usando las secuencias desveladas en la Figura 12A y 12B.

Se aplicarían los mismos principios para la preparación de construcciones con secuencias desveladas en la Figura 12C y 12D.

Ejemplo V: Vacunación contra WNV con un virus vivo atenuado del sarampión (cepa Schwarz) que expresa la forma secretada de la glicoproteína E del WNV (virus del Nilo occidental).

Construimos un virus atenuado recombinante del sarampión Schwarz que expresaba la forma soluble de E de WNV y ensayamos su capacidad como vacuna candidata contra la encefalitis WN. El ADNc de WN correspondiente a la proteína sE de la cepa IS-98-ST1 de WNV se introdujo en una unidad de transcripción adicional en el ADNc de MV Schwarz (pTM-MVSchw CNCM I-2889). Después de recuperar el virus recombinante del sarampión Schwarz, se ensayó su capacidad de proteger a los ratones de una encefalitis letal por WNV después de exposición intraperitoneal.

A) Materiales y métodos**A.1 Células y virus WN**

La cepa IS-98-ST1 del virus WN en células de mosquito *Aedes* AP61 de acuerdo con el protocolo descrito en Desprès et al. (51), Mashimo et al. (52) y Lucas et al. (53). El clon celular Vero-NK usado en este estudio se seleccionó por su capacidad de fusionarse después de infección con virus del sarampión y de amplificar el virus WN.

A.2 Titulación del WN en células de mosquito AP61 por inmunodetección de focos de replicación viral (Inmunoensayo de foco, FIA (del inglés Focus Immuno Assay)).

La titulación se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en Desprès et al. (51), Mashimo et al. (52) y Lucas et al. (53).

El título infeccioso de virus WN en células AP61 se determinó como unidades formadoras de focos en células AP61 (AP61 UFF/ml).

A.3 Purificación de virus WN producido en células AP 61.

La purificación se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en Desprès et al. (51), Mashimo et al. (52) y Lucas et al. (53).

En resumen, las partículas virales presentes en sobrenadantes de células AP61 infectadas durante 3 días con la cepa IS-98-ST1 del virus WN (MOI 0,4) se concentraron en PEG 6000 al 7 % y después se purificaron en gradiente de sacarosa discontinuo del 30-60 % y en gradiente de sacarosa lineal del 10-50 %. Los viriones WN en sacarosa al 30 % se almacenaron a - 80 °C. Los títulos infecciosos obtenidos fueron de aproximadamente 10^{10} AP61 FFU/ml.

A.4 Detección de anticuerpos anti-WN en ELISA

Los títulos de anticuerpos anti-WN de sueros diluidos (1:100) se determinaron por ELISA en una cantidad dada de 10^6 AP61 FFU de viriones WN IS-98-ST1 purificados en gradiente de sacarosa. El protocolo se describe en Desprès et al. (1993) y Mashimo et al. (2002).

A.5 Sueros inmunes anti-WN

Se recogieron sueros inmunes anti-WN en ratones adultos genéticamente resistentes a encefalitis vírica (Mashimo et al. 2002) que se ensayaron durante al menos un mes con inoculación intraperitoneal de 10³ AP61 FFU de la cepa IS-98-ST1 del virus WN.

5 El título de anticuerpos anti-WN de sueros inmunes diluidos 1:100 se midieron en ELISA y fueron de aproximadamente 1,4 unidades DO. Los títulos neutralizantes (TNRF90) de sueros anti-WN fueron de aproximadamente 1600.

10 Se obtuvieron los fluidos ascíticos de ratones (HMAF) contra la cepa IS-98-ST1 de WN de animales que se habían hiperinmunizado con homogeneizados de cerebro de crías de ratón inoculadas con WN. Los títulos ELISA de HMAF anti-WN, diluidos a 1:1000 fueron de aproximadamente 1 unidad DO.

Los sueros inmunes anti-WN se usaron para inmunofluorescencia indirecta y para ensayos de seroprotección pasiva contra la enfermedad. Se usaron HMAF anti-WN para inmunodetección en membrana de proteínas virales.

A6. Construcción de virus recombinante del sarampión Schwarz que expresa sE de WN

15 Se generó el gen env de WNV que codificaba la forma secretada de la proteína por amplificación por RT-PCR del ARN viral purificado de partículas virales (cepa IS-98-ST1 de WNV). La secuencia específica se amplificó usando la ADN polimerasa *PfuTurbo* (Stratagene) y cebadores específicos que contienen sitios únicos para la posterior clonación en el vector pTM-MV Schw: MV-WNEnv5 5'-TATCGTACGATGAGAGTTGTGTTTGTCTGCTGCTA-3' (sitio *BsiWI* subrayado) y MV-WNEnv3 5'-ATAGCGCGCTTAGACAGCCTTCCCAACTGA-3' (sitio *BssIII* subrayado). Se añadieron un codón de inicio y una de parada en ambos extremos del gen. La secuencia completa generada es de 20 1380 nucleótidos de longitud, incluyendo los codones de inicio y parada y respeta la "regla de seis", que estipula que la cantidad de nucleótidos del genoma de MV debe ser divisible por 6 [Calain, 1993 (7); Schneider, 1997 (28)]. La proteína Env generada de este modo contiene su péptido señal en el extremo N (18 aa) y sin región transmembrana. Por tanto, representa los aminoácidos 275-732 en la poliproteína de WNV y tiene la siguiente secuencia:

**atgagagttgtgtttgtcgtgctattgcttttggtggccccagcttacagcttcaactgccttggaatg
 agcaacagagacttcttgaaggagtgtctggagcaacatgggtggatttggttctcgaaggcg
 acagctgctgactatcatgtctaaggacaagcctaccatcgatgtgaagatgatgaatatggag
 gcggtcaacctggcagaggtccgcagttattgctatttggctaccgtcagcgatctctccaccaa
 agctgctgccccgacctgggagaagctcacaatgacaacgtgctgaccagcttttgtgtgc
 agacaaggagtggaggacaggggctggggcaacggctgaggattattggcaaaggaagcat
 tgacacatgcgccaaattgctgctctaccaaggcaataggaagaacctcttgaagagaat
 atcaagtacgaagtggcattttgtccatggaccaactactgtggagtgcacggaaactactc
 cacacaggttgagaccactcaggcagggagattcagcatcactcctgctggcgccttcatacac
 actaaagcttgagaatatggagaggtgacagtggactgtgaaccacgggtcagggattgacac
 caatgcatactacgtgatgactgttgaacaaagacgttcttggccatcgtagtggttcatgga
 cctcaacctcccttgagcagtgctggaagtactgtgtggaggaacagagagacgttaattggag
 tttgaggaaccacacgccacgaagcagctctgtgatagcattgggctcacaagaggagctctg
 catcaagctttggctggagccattcctgtggaatttcaagcaacactgtcaagttgacgtcgggt
 catttgaagtgtagagtgaagatggaaaaattgagttgaagggaacaacctatggcgtctgttc
 aaaggcttcaagtttcttggactcccgcagacacaggtcacggcactgtggttggattgac
 agtacactggcaggtatggacctgcaagttcctatctcgtcagtggttcatgaacgacctaa
 cgccagtgggcagattggctcactgtcaacctttgtttcagtgggccacggccaacgctaaggctc
 ctgattgaattggaaccacctttggagactcatatagtggtggcagaggagaacaacaga
 tcaatcaccattggcacaagctggaagcagcattggcacaagccttacaaccacctcaagg**

agcgcagagactagccgctctaggagacacagctgggactttggatcagttggaggggtgttc
acctcagttgggaaggctgtctaa

MRVVFVLLLLLVAPAYSFNCLGMSNRDFLEGVSGATWVDLVLEGDSCVT
IMSKDKPTIDVKMMNMEAVNLAEVRSYCYLATVSDLSTKAACPTMGEAH
NDKRADPAFVCRQGVVDRGWGNGCGLFGKGSIDTCAKFACSTKAIGRTI
LKENIKYEVAIFVHGPTTVESHGNYSTQVGATQAGRFSITPAAPSYTLKLG
EYGEVTVDCEPRSGIDTNAYYVMTVGTKTFLVHREWFMDLNLPWSSAGS
TVWRNRETLMEFEHPHATKQSVIALGSQEGALHQALAGAIPEFSSNTVK
LTSGHLKCRVKMEKLQLKGTTYGVCSKAFKFLGTPADTGHGTVVLELQY
TGTDGPCKVPISSVASLNDLTPVGRVTVNPFVSVATANAKVLIELEPPFG
DSYIVVGRGEQQINHHWHKSGSSIGKAFTTTLKGAQRLAALGDTAWDFG
SVGGVFTSVGKAV*

Después de purificación en gel de agarosa, se clonó el fragmento de PCR en el plásmido pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y se secuenció para comprobar que no se introdujeron mutaciones. Después de digestión con *BsWI/BssHII* del plásmido pCR2.1-TOPO, se clonó el fragmento de ADN en el vector pTM-MV Schw en la posición ATU 2 dando el plásmido: pTM-MV Schw-sE_{WNV} de acuerdo con la Figura 13.

A7. Producción de virus recombinante del sarampión que expresa sE de WN

Para recuperar MV recombinante del plásmido, usamos el sistema de recuperación basado en células auxiliares descrito por Radecke et al. [Radecke, 1995 (35)] y modificado por Parks et al. [Parks, 1999 (40)]. Se transfectaron células auxiliares humanas que expresaban de forma estable la ARN polimerasa T7 y las proteínas N y P del sarampión (células 293-3-46, un amable presente de MA Billeter, University of Zurich) usando el procedimiento de fosfato cálcico con el plásmido pTM-MV Schw-sE_{WNV} (5 µg) y un plásmido que expresaba el gen L de la polimerasa de MV (pEMC-La, 20 ng). Después de incubación durante una noche a 37 °C, se reemplazó el medio de transfección por medio fresco y se aplicó un choque térmico (43 °C durante dos horas) [Parks, 1999 (40)]. Después de dos días de incubación a 37 °C, las células transfectadas se transfirieron sobre una capa de células FEP y se incubaron a 32 °C para evitar la adaptación de la vacuna Schwarz que se seleccionó originalmente en células FEP y actualmente se cultiva en estas células. El virus infeccioso se recuperó entre 3 y 7 días después del cocultivo. El virus recombinante también se recuperó por la misma técnica después de cocultivo de células auxiliares 293-3-46 transfectadas a 37 °C con células Vero (riñón de mono verde africano, clon Vero-NK). Para aumentar el rendimiento de recuperación y como estos virus recombinantes se prepararon para usarse en experimentos con ratones, usamos células Vero como células productoras en lugar de los habituales fibroblastos embrionarios de pollo (FEP). Se recogieron sincitios individuales y se transfirieron a células Vero cultivadas en pocillos de 35 mm en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de ternera fetal al 5 % (FCS). Las células infectadas se expandieron en matraces de 75 y 150 cm³. Cuando los sincitios alcanzaron una confluencia del 80-90 % (habitualmente 36-48 horas después de la infección), las células se rasparon en un pequeño volumen de OptiMEM® (Gibco BRL) y se congelaron y descongelaron una vez. Después de centrifugación a baja velocidad para sedimentar los desechos celulares, se almacenó el sobrenadante, que contenía el virus, a -80 °C. Los presentes inventores han demostrado que dos pases del virus Schwarz en células Vero no cambiaba sus capacidades inmunogénicas en macacos.

A8. Titulación de virus MV-WN recombinante

Los títulos de MV recombinante se determinaron por un ensayo de dilución limitante de punto final en células Vero. Las dosis infecciosas en cultivo tisular al 50 % (DICT₅₀) se calcularon usando el método de Kärber [Kärber, 1931 (41)].

A9. Detección por inmunofluorescencia de sE de WNV expresada en células Vero infectadas por virus recombinante MV-WN sE.

La expresión de la proteína sE de WN en células infectadas por MV-WN sE recombinante se detectó por inmunofluorescencia. Se cultivaron células Vero en cubreobjetos recubiertos de poliornitina y se infectaron por MV-WN sE a una MOI de 0,05. Después de dos días de infección, los cubreobjetos se lavaron dos veces en PBS y se fijaron durante 15 minutos en paraformaldehído (4 % en PBS). En algunos casos, las células se permeabilizaron por Triton X100 (0,1 %, 5 min). Después de dos lavados con PBS, los cubreobjetos se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en PBS con suero de cabra al 2 %, después se incubaron durante 1 hora a temperatura

ambiente con sueros inmunes de ratón anti-WNV o HMAF de ratón anti-WNV (véase A5) diluidos en PBS con suero de cabra al 2 %. Después de lavar en PBS, las células se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con R-ficoeritrina (SBA, Birmingham). Después de lavar en PBS, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con fluoromount (Southern Biotech Associates inc., Birmingham, Alabama).

A10. Detección de anticuerpos anti-MV por ELISA

Los anticuerpos anti-MV se detectaron usando un kit ELISA convencional (Trinity Biotech, EEUU). Se usó un conjugado anti-anticuerpo de ratón-HRP (Amersham) como anticuerpos secundario. Los títulos se determinaron por diluciones limitantes y se calcularon como la dilución más elevada de suero que daba dos veces la absorbencia de una dilución 1/100 de una mezcla de sueros de control.

A.11 Ensayo de neutralización por reducción de los focos de replicación viral (TNRF90) en células VERO.

Se prepararon diluciones sucesivas de sueros para ensayar en DMEM Glutamax[®] con FCS (suero de ternera fetal) descomplementado al 2 % en tubos de 0,5 ml.

Para 0,1 ml de suero diluido en DMEM Glutamax[®] con FCS al 2 %, se añadió 0,1 ml de DMEM Glutamax[®]/FCS al 2 % que contenía 100 AP61 UFF de la cepa IS-98-ST1 de virus WN.

Célula de control: 0,2 ml de DMEM FCS al 0,2 %

Virus de control: 0,2 ml de DMEM Glutamax[®]/FCS al 2 % que contenía 100AP61 UFF de la cepa IS-98-ST1 de virus WN. 2 horas con rotación leve a 37 °C.

Placas con 12 pocillos con ~ 150.000 células VERO HK por pocillo que se cultivan en monocapas durante 24 horas en DMEM Glutamax[®] FCS al 5 %

1 lavado en DMEM de las capas celulares.

Añadir 0,2 ml de DMEM Glutamax[®]/SVF al 2 %

Añadir 0,2 ml de una mezcla de suero/virus WN en las capas celulares.

Incubar 2 horas a 37 °C en CO₂.

Retirar la mezcla de suero/virus WN de las capas de células infectadas.

1 lavado en DMEM de las capas de células infectadas.

Añadir 1 ml de DMEM SVF al 2 % por pocillo.

Añadir 1 ml de CMC al 1,6 % diluido en DMEM Glutamax[®]/SVF al 2 %

Incubar 2 días a 37 °C en CO₂.

Las placas se revelaron a través de la técnica FIA. Se determinó la última dilución de los sueros inmunes que neutraliza al menos 90 de 100 UFF del virus WN ensayados en células VERO (TNRF90: Ensayo de Neutralización por Reducción de los Focos de replicación viral al 90 % (del francés Test de Neutralisation par Réduction de Foyers de replication virale à 90 %)). El título de anticuerpos neutralizantes de los sueros se determinó por TNRF90.

A.12 Producción de pseudo-partículas de virus WN por la línea celular MEF/3T3.Tet-Off/pr ME.WN #h2.

Se secretaron pseudo-partículas de la cepa IS-98-ST1 del virus WN compuestas por glicoproteínas complejadas prME por la línea MEF/3T3.Tet-Off/pr ME.WN #h2 inducida para la expresión de proteínas virales (CNCM I-3018). Se purificaron de los sobrenadantes de cultivo celular de 3 días de acuerdo con el protocolo usado para la purificación del virus WN.

Ensayo de seroprotección pasiva contra el virus WN en ratones BALB/c adultos. El Janvier breeding Center proporcionó ratones BALB/c de 6 semanas de edad. La dosis para el ensayo viral es de 100 ap61 UFF, es decir, 10 DL 50 (Tomoshi et al. 2002) diluida en 100 µl de DPBS suplementado con BSA (albúmina sérica bovina) al 0,2 % pH 7.5 (Sigma) que se inocula por vía intraperitoneal. El tiempo promedio para el efecto letal fue 10 días. Los animales se observaron durante 2 a 3 semanas.

Los sueros a ensayar para seroprotección pasiva en ratones se diluyen en DPBS al 0,1 %/BSA al 0,2 % y se inoculan 24 horas antes del ensayo viral.

B) Resultados y conclusiones**B1. Producción de virus recombinante del sarampión que expresa sE de WN**

Se insertó el ADNc que codifica la proteína E de la cepa IS-98-ST1 de WNV con su región de anclaje transmembrana delecionada en el genoma del virus del sarampión (cepa Schwarz) de acuerdo con la Figura 13.

5 B.2. Ensayos preliminares de seroprotección pasiva contra el virus WN en ratones

Los sueros inmunes anti-WN a ensayar se obtuvieron de ratones genéticamente resistentes a la enfermedad (52). Los sueros anti-WN, recién tomados, se inyectaron a diluciones 1:10 (16 TNRF90) y 1:40 (4 TNRF90) en un volumen final de 0,1 ml de DPBS/SAB al 0,2 % por vía intraperitoneal en ratones BALB/c adultos genéticamente sensibles. Los anticuerpos se administraron solamente 24 horas antes del ensayo viral o 24 horas antes y 24 horas después del ensayo con 10 DL₅₀ de la cepa IS-98-ST1 del virus WN. El control negativo fue la inyección de suero 5 normal en ratones a 1:10. La neurovirulencia del virus WN se devaluó en ratones ensayados con DPBS/SAB al 0,2 %. Los resultados de protección pasiva después de dos semanas de ensayos virales son los siguientes:

Tabla 1: Seroprotección pasiva contra encefalitis por WNV en ratones BALB/c adultos.

Transferencia pasiva	Mortalidad	MDOD*
PBS/BSA (0,2 %)	6\6	10,5 (± 1,5)
suero normal (1:10)	6\6	12,5 (± 1,5)
suero anti-WNV (1:10), 2 dosis**	0\6	NA
suero anti-WNV (1:40), 2 dosis	0\6	NA
suero anti-WNV (1:10), 1 dosis***	1\6	12
suero anti-WNV (1:40), 1 dosis	0\6	NA

(*Día medio de muerte ± DE)
(**Día -1 y día +1 de exposición al virus)
(***) Día -1 de exposición al virus)

15 Para concluir, una única inyección de anticuerpos anti-WN (2,5 a 10 µl de suero) obtenidos de ratones genéticamente resistentes al virus WN, realizándose dicha inyección por vía intraperitoneal en ratones adultos sensibles a encefalitis vírica, proporciona protección pasiva contra una dosis de ensayo.

20 Se observa que los sueros de ratones BALB/c que han recibido anticuerpos protectores anti-WN y resistentes a infección vírica tienen títulos de anticuerpos anti-WN por ELISA que son de aproximadamente 1 unidad DO (para una dilución de suero de 1:100) después de un mes de ensayo. Esto indica que el virus WN inoculado para el ensayo ha conseguido replicarse en ratones protegidos, induciendo una respuesta humoral. Si la seroprotección pasiva protege contra la encefalitis letal debida al virus WN, no parece ser apropiada para prevenir la propagación vírica en individuos infectados.

B.3. Vacunación de ratones de CD46^{+/-} IFN-α/βR^{-/-} con virus MV/WN sE

25 Se obtuvieron ratones susceptibles a infección MV como se ha descrito previamente [Mrkic, 1998 (21)]. Se cruzaron ratones FVB heterocigóticos para el transgén del receptor de CD46 de MV [Yannoutsos, 1996 (32)] con ratones 129Sv IFN-α/1R^{-/-} [Muller, 1994 (22)]. La descendencia F1 se exploró por PCR y se cruzaron los animales CD46^{+/-} de nuevo con ratones 129Sv IFN-α/1R^{-/-}. Se seleccionaron los animales IFN-α/1R^{-/-} CD46^{+/-} y se usaron para experimentos de inmunización. Se inocularon ratones CD46^{+/-}IFN-α/1R^{-/-} de seis semanas de edad por vía
30 intraperitoneal con una única dosis de vacuna convencional contra MV (10⁶ DICT₅₀, 3 ratones) o virus recombinante MV-WN sE (10⁴ o 10⁶ DICT₅₀, 6 ratones por dosis) en 300 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Se ha recogido un suero del ojo después de un mes de vacunación con una única dosis para determinar la producción de anticuerpos anti-MV, anti-E de WN y neutralizantes contra el virus de ensayo.

b) Sueros diluidos a 1:100 y ensayados para anticuerpos por ELISA sobre virión NV purificado, para:

	unidad DO
Fluido ascítico de ratones anti-WN:	1 (control +)
Suero de ratones anti-WN:	0,8 (control +)
Suero de ratones vacunados con MV:	0,110 ± 0,005
Suero de ratones vacunados con MV/WN sE, 10 ⁴ DCIP ₅₀ :	0,635 ± 0,040 (machos)
Suero de ratones vacunados con MV/WN sE, 10 ⁴ DCIP ₅₀ :	0,815 ± 0,005 (hembras)
Suero de ratones vacunados con MV/WN sE, 10 ⁶ DCIP ₅₀ :	0,800 ± 0,200 (machos)
Suero de ratones vacunados con MV/WN sE, 10 ⁶ DCIP ₅₀ :	0,900 ± 0,195 (hembras)

c) Ensayo de seroneutralización *in vitro* para WNV en células VERO.

TNRF90 de combinaciones de sueros en 100 AP61UFF de la cepa IS-98-ST1 del virus WN en células VERO:

	TNRF ₉₀
Suero de ratones vacunados con MV:	< 10
Suero de ratones vacunados con MV MV-WN sE, 10 ⁴ DCIP ₅₀ :	400
Suero de ratones vacunados con MV MV-WN sE, 10 ⁶ DCIP ₅₀ :	800

5 Para concluir, los anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína E soluble del virus WN tienen la capacidad de neutralizar la cepa IS-98-ST1 usada para el ensayo por virus WN en ratones *in vitro*.

Se ha realizado un refuerzo de vacuna en ratones CD46^{+/+} IFN- α / β R^{-/-} inmunizados 1 mes después de empezar la vacunación con una dosis única, idéntica a la dosis de la primera inyección.

Después de 2 semanas de refuerzo, se ensayaron los sueros por ELISA y en TNRF90 como anteriormente:

a) Sueros diluidos a 1:100 y ensayados para anticuerpos por ELISA sobre virión de WN purificado:

	unidad DO
Fluido ascítico de ratones anti-WN:	1,4 (control +)
Suero de ratones anti-WN:	1 (control +)
Suero de ratones vacunados con MV:	0,110 ± 0,005
Suero de ratones vacunados con MV/WN sE, 10 ⁴ DCIP ₅₀ :	0,810 ± 0,100 (machos)
Suero de ratones vacunados con MV/WN sE, 10 ⁴ DCIP ₅₀ :	1,150 ± 0,015 (hembras)
Suero de ratones vacunados con MV/WN sE, 10 ⁶ DCIP ₅₀ :	0,965 ± 0,230 (machos)
Suero de ratones vacunados con MV/WN sE, 10 ⁶ DCIP ₅₀ :	1,075 ± 0,240 (hembras)

10 b) Ensayo de seroneutralización *in vitro* en células VERO

TNRF90 de combinaciones de sueros en 100 AP61UFF de la cepa IS-98-ST1 del virus WN en células VERO:

	TNRF ₉₀
Suero de ratones reforzados con MV:	<10
Suero de ratones reforzados con MV-WN sE, 10 ⁴ DCIP ₅₀ :	> 1600
Suero de ratones reforzados con MV-WN sE, 10 ⁶ DCIP ₅₀ :	> 1600

Después de 4 semanas de refuerzo, se ensayaron los sueros por ELISA y en TNRF90 como anteriormente:

a) Sueros diluidos a 1:100 y ensayados para anticuerpos por ELISA sobre virión de WN purificado:

	unidad DO
Fluido ascítico de ratones anti-WN:	1,7 (control +)
Suero de ratones anti-WN:	1,2 (control +)
Suero de ratones vacunados con MV:	0,2
Suero de ratones vacunados con MV/WN sE, 10 ⁴ DCIP ₅₀ :	1,52 (± 0,15)
Suero de ratones vacunados con MV/WN sE, 10 ⁶ DCIP ₅₀ :	1,76 (± 0,10)

b) Seroneutralización *in vitro* en células VERO

TNRF90 de combinaciones de sueros en 100 AP61UFF de la cepa IS-98-ST1 del virus WN en células VERO:

	TNRF ₉₀
Suero de ratones vacunados con MV-WN sE, 10 ⁴ DCIP ₅₀ :	4000 (machos)
Suero de ratones vacunados con MV-WN sE, 10 ⁴ DCIP ₅₀ :	8000 (hembras)
Suero de ratones vacunados con MV-WN sE, 10 ⁶ DCIP ₅₀ :	10.000 – 12.000

5 Para concluir, después de un refuerzo con una dosis única, los títulos de anticuerpos anti-WNV y los títulos de anticuerpos neutralizantes anti-WNV se aumentaron significativamente por un factor 10 o más.

Se ensayan esplenocitos de ratones CD46^{+/-}IFN- α /1R^{-/-} inmunizados con dos inyecciones separadas por 4 semanas con el virus MV-WN sE con dosis de 10⁴ o 10⁶ DCIP₅₀ en ELISpot y citometría de flujo para la respuesta T CD4 y CD8 después de estimulación *in vitro* con pseudo-partículas virales purificadas en gradientes de sacarosa partiendo de sobrenadantes de la línea celular inducida MEF/3T3.Tet-Off/prME.WN #h-2 (CNCM I-3018).

10 **B.4. Ensayo de seroprotección pasiva anti-WN en BALB/c con anticuerpos anti-E**

Se han recogido los sueros inmunes de ratones CD46^{+/-}IFN- α /1R^{-/-} vacunados con una dosis única de virus recombinante del sarampión después de un mes. Se han inyectado diversas diluciones de estos sueros en un volumen final de 0,1 ml en ratones BALB/c de 6 semanas de edad y solamente 24 horas antes de la inoculación de 100 AP61UFF de la cepa IS-98-ST1 del virus WN (10 DL₅₀) por vía intraperitoneal (véase el protocolo en § B2).

15 Los resultados de protección pasiva después de dos semanas de ensayo viral son los siguientes:

Tabla 2: MV-WN sE recombinante induce anticuerpos que proporcionan protección completa contra la encefalitis por WNV en ratones BALB/c

Transferencia pasiva	Mortalidad	Día
PBS/BSA (0.2%)	6\6	10 a 11
suero anti-WNV (1:10), 1 dosis*	0\6	NA
suero anti-WNV (1:40), 1 dosis	1\6	20
anti-MV (1:10), 1 dosis	4\6	10 a 11
anti-MV-WN sE 10e4 (1:10), 1 dosis	3\6	8 a 10
anti-MV-WN sE 10e6 (1:10), 1 dosis	0\6	NA
anti-MV-WN sE 10e6 (1:40), 1 dosis	0\6	NA
anti-MV-WN sE 10e6 (1:100), 1 dosis	3\6	10 a 11

(*Día -1 de exposición al virus)

Para concluir, los anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína E soluble del virus WN tienen la capacidad de

proteger *in vivo* contra la encefalitis por el virus WN. La vacunación de ratones CD46^{+/+}IFN- α /1R^{-/-} con una dosis de 10⁶ DCIP₅₀ del virus MV-WN sE como única inyección es necesaria para inducir una respuesta humoral anti-E de WN en un periodo de tiempo de cuatro semanas que es capaz de proteger contra la enfermedad por seroprotección pasiva. Un volumen mínimo de 2,5 μ l de suero inmune de ratones vacunados con virus MV-WN sE, es suficiente para proporcionar una protección completa en ratones BALB/c adultos ensayados con una dosis letal de virus WN (es decir, una proporción de aproximadamente 0,1 ml de suero inmune/kg). Se observa que los sueros anti-letales diluidos a 1:10 inducen una protección parcial (aproximadamente del 30 %) contra la encefalitis por el virus del Nilo occidental. Los sueros obtenidos en ratones CD46^{+/+}IFN- α /1R^{-/-} vacunados que después se han reforzado con una dosis débil (10⁴ DICT₅₀) se ensayarán para su capacidad de proporcionar protección pasiva en ratones BALB/c.

10 **B.5. Ensayo viral en ratones CD46^{+/+}IFN- α /1R^{-/-} vacunados con MV-WN sE**

Se han ensayado ratones CD46^{+/+}IFN- α /1R^{-/-} vacunados 2 meses después de las 2 inyecciones de 10⁶ DCIP₅₀ de virus MV-WN sE, realizándose estas inyecciones a intervalos de 4 semanas, con 100 AP61UFF de la cepa IS-98-ST1 del virus WN administradas por vía intraperitoneal.

15 Los 2 ratones vacunos con virus del sarampión convencional murieron el tercer día del ensayo. No se observó morbilidad o letalidad para ratones vacunados con MV-WN sE en el séptimo día del ensayo. Para concluir, los ratones CD46^{+/+}IFN- α /1R^{-/-} inmunizados contra gpE soluble del virus WN están protegidos contra una dosis de ensayo letal del virus WN en ausencia de actividad anti-viral de alfa-interferón.

20 B6. Nuevo ensayo de vacunación anti-WN con un refuerzo de antígeno Se vacunan ratones CD46^{+/+}IFN- α /1R^{-/-} adultos en un periodo de tiempo de 4 semanas con virus MV-WN sE a una dosis de 10⁴ DCIP₅₀ que se propone para seres humanos y se realiza un refuerzo con un antígeno con pseudo-partículas purificadas de virus WN que se secretan por la línea celular MEF/3T3.Tet-Off/WN prME # h2.

BIBLIOGRAFÍA

- 25 1. Amara, R. R., F. Villinger, J. D. Altman, S. L. Lydy, S. P. O'Neil, S. I. Staprans, D. C. Montefiori, Y. Xu, J. G. Herndon, L. S. Wyatt, M. A. Candido, N. L. Kozyr, P. L. Earl, J. M. Smith, H. L. Ma, B. D. Grimm, M. L. Hulse, J. Miller, H. M. McClure, J. M. McNicholl, B. Moss, and H. L. Robinson. 2001. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science*. 292:69-74.
- 30 2. Baba, T. W., V. Liska, R. Hofmann-Lehmann, J. Vlasak, W. Xu, S. Ayehunie, L. A. Cavacini, M. R. Posner, H. Katinger, G. Stiegler, B. J. Bernacky, T. A. Rizvi, R. Schmidt, L. R. Hill, M. E. Keeling, Y. Lu, J. E. Wright, T. C. Chou, and R. M. Ruprecht. 2000. Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat Med*. 6:200-206.
- 35 3. Barnett, S. W., S. Lu, I. Srivastava, S. Cherpelis, A. Gettie, J. Blanchard, S. Wang, I. Mboudjeka, L. Leung, Y. Lian, A. Fong, C. Buckner, A. Ly, S. Hilt, J. Ulmer, C. T. Wild, J. R. Mascola, and L. Stamatatos. 2001. The ability of an oligomeric human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope antigen to elicit neutralizing antibodies against primary HIV-1 isolates is improved following partial deletion of the second hypervariable region. *J Virol*. 75:5526-5540.
- 40 4. Binley, J. M., R. W. Sanders, B. Clas, N. Schuelke, A. Master, Y. Guo, F. Kajumo, D. J. Anselma, P. J. Maddon, W. C. Olson, and J. P. Moore. 2000. A recombinant human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein complex stabilized by an intermolecular disulfide bond between the gp120 and gp41 subunits is an antigenic mimic of the trimeric virion-associated structure. *J Virol*. 74:627-643.
5. Boyer, J., K. Ugen, B. Wang, M. Agadjanyan, L. Gilbert, M. Bagarazzi, M. Chattergoon, P. Frost, A. Javadian, W. Williams, Y. Refaeli, R. Ciccarelli, D. McCallus, L. Coney, and D. Weiner. 1997. Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nature Medicine*. 3:526-532.
- 45 6. Burton, D. 1997. A vaccine for HIV type 1: the antibody perspective. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:10018-10023.
7. Calain, P., and L. Roux. 1993. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol*. 67:4822-4830.
8. Collman, R., J. W. Balliet, S. A. Gregory, H. Friedman, D. L. Kolson, N. Nathanson, and A. Srinivasan. 1992. An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 66:7517-7521.
- 50 9. Crotty, S., C. J. Miller, B. L. Lohman, M. R. Neagu, L. Compton, D. Lu, F. X. Lu, L. Fritts, J. D. Lifson, and R. Andino. 2001. Protection against simian immunodeficiency virus vaginal challenge by using Sabin poliovirus vectors. *J Virol*. 75:7435-7452.

10. Hoffman, T. L., C. C. LaBranche, W. Zhang, G. Canziani, J. Robinson, I. Chaiken, J. A. Hoxie, and R. W. Doms. 1999. Stable exposure of the coreceptor-binding site in a CD4-independent HIV-1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:6359-6364.
- 5 11. Hu, S., P. Polacino, V. Stallard, J. Klaniecki, S. Pennathur, B. Travis, L. Misher, H. Kornas, A. Langlois, W. Morton, and R. Benveniste. 1996. Recombinant subunit vaccines as an approach to study correlates of protection against primate lentivirus infection. *Immunology Letters*. 51:115-119.
12. Karlsson, G. B., M. Halloran, J. Li, I. W. Park, R. Gomila, K. A. Reimann, M. K. Axthelm, S. A. Iloff, N. L. Letvin, and J. Sodroski. 1997. Characterization of molecularly cloned simian-human immunodeficiency viruses causing rapid CD4+ lymphocyte depletion in rhesus monkeys. *J Virol*. 71:4218-4225.
- 10 13. Kwong, P. D., R. Wyatt, S. Majeed, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson. 2000. Structures of HIV-1 gp120 envelope glycoproteins from laboratory- adapted and primary isolates. *Structure Fold Des*. 8:1329-1339.
14. Kwong, P. D., R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 393:648-659.
- 15 15. Kwong, P. D., R. Wyatt, Q. J. Sattentau, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson. 2000. Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *J Virol*. 74:1961-1972.
- 20 16. Mascola, J. R., M. G. Lewis, G. Stiegler, D. Harris, T. C. VanCott, D. Hayes, M. K. Louder, C. R. Brown, C. V. Sapan, S. S. Frankel, Y. Lu, M. L. Robb, H. Katinger, and D. L. Birx. 1999. Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J Virol*. 73:4009-4018.
- 25 17. Mascola, J. R., M. K. Louder, T. C. VanCott, C. V. Sapan, J. S. Lambert, L. R. Muenz, B. Bunow, D. L. Birx, and M. L. Robb. 1997. Potent and synergistic neutralization of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 primary isolates by hyperimmune anti-HIV immunoglobulin combined with monoclonal antibodies 2F5 and 2G12. *J Virol*. 71:7198-7206.
18. Mascola, J. R., and G. J. Nabel. 2001. Vaccines for prevention of HIV-1 disease. *Immunology*. 13:489-495.
- 30 19. Mascola, J. R., G. Stiegler, T. C. VanCott, H. Katinger, C. B. Carpenter, C. E. Hanson, H. Beary, D. Hayes, S. S. Frankel, D. L. Birx, and M. G. Lewis. 2000. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV- 1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med*. 6:207-210.
20. Mrkic, B., B. Odermatt, M. Klein, M. Billeter, J. Pavlovic, and R. Cattaneo. 1999. Lymphatic dissemination and comparative pathology of recombinant measles viruses in genetically modified mice. *Journal of Virology*. 74:1364-1372.
- 35 21. Mrkic, B., J. Pavlovic, T. Rulicke, P. Volpe, C. J. Buchholz, D. Hourcade, J. P. Atkinson, A. Aguzzi, and R. Cattaneo. 1998. Measles virus spread and pathogenesis in genetically modified mice. *J Virol*. 72:7420-7427.
22. Muller, U., U. Steinhoff, L. F. L. Reis, S. Hemmi, J. Pavlovic, R. M. Zinkernagel, and M. Aguet. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*. 264:1918-1921.
23. Muster, T., F. Steindl, M. Purtscher, A. Trkola, A. Klima, G. Himmler, F. Ruker, and H. Katinger. 1993. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 67:6642-6647.
- 40 24. Nanche, D., G. Varior-Krishnan, F. Cervoni, T. F. Wild, B. Rossi, C. Rabourdin-Combe, and D. Gerlier. 1993. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol*. 67:6025-6032.
25. Parren, P. W., M. C. Gauduin, R. A. Koup, P. Poignard, P. Fiscaro, D. R. Burton, and Q. J. Sattentau. 1997. Relevance of the antibody response against human immunodeficiency virus type 1 envelope to vaccine design. *Immunol Lett*. 57:105-112.
- 45 26. Reimann, K. A., J. T. Li, R. Veazey, M. Halloran, I. W. Park, G. B. Karlsson, J. Sodroski, and N. L. Letvin. 1996. A chimeric simian/human immunodeficiency virus expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate env causes an AIDS- like disease after in vivo passage in rhesus monkeys. *J Virol*. 70:6922-6928.
- 50 27. Sanders, R. W., L. Schiffner, A. Master, F. Kajumo, Y. Guo, T. Dragic, J. P. Moore, and J. M. Binley. 2000. Variable-loop-deleted variants of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein can be stabilized by an intermolecular disulfide bond between the gp120 and gp41 subunits. *J Virol*. 74:5091-5100.

28. Schneider, H., K. Kaelin, and M. A. Billeter. 1997. Recombinant measles viruses defective for RNA editing and V protein synthesis are viable in cultured cells. *Virology*. 227:314-322.
- 5 29. Shiver, J. W., T. M. Fu, L. Chen, D. R. Casimiro, M. E. Davies, R. K. Evans, Z. Q. Zhang, A. J. Simon, W. L. Trigona, S. A. Dubey, L. Huang, V. A. Harris, R. S. Long, X. Liang, L. Handt, W. A. Schleif, L. Zhu, D. C. Freed, N. V. Persaud, L. Guan, K. S. Punt, A. Tang, M. Chen, K. A. Wilson, K. B. Collins, G. J. Heidecker, V. R. Fernandez, H. C. Perry, J. G. Joyce, K. M. Grimm, J. C. Cook, P. M. Keller, D. S. Kresock, H. Mach, R. D. Troutman, L. A. Isopi, D. M. Williams, Z. Xu, K. E. Bohannon, D. B. Volkin, D. C. Montefiori, A. Miura, G. R. Krivulka, M. A. Lifton, M. J. Kuroda, J. E. Schmitz, N. L. Letvin, M. J. Caulfield, A. J. Bett, R. Youil, D. C. Kaslow, and E. A. Emini. 2002. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature*. 415:331-335.
- 10 30. Thali, M., J. P. Moore, C. Furman, M. Charles, D. D. Ho, J. Robinson, and J. Sodroski. 1993. Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J Virol*. 67:3978-3988.
- 15 31. Trkola, A., M. Purtscher, T. Muster, C. Ballaun, A. Buchacher, N. Sullivan, K. Srinivasan, J. Sodroski, J. P. Moore, and H. Katinger. 1996. Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 70:1100-1108.
32. Yannoutsos, N., J. N. Ijzermans, C. Harkes, F. Bonthuis, C. Y. Zhou, D. White, R. L. Marquet, and F. Grosveld. 1996. A membrane cofactor protein transgenic mouse model for the study of discordant xenograft rejection [published erratum appears in *Genes Cells* 1996 Aug;1(8):785]. *Genes Cells*. 1:409-419.
- 20 33. Griffin, D. 2001. Measles virus, P. 1401-1441. In D. Knipe and P. Howley (ed.), *Field's Virology*, 4th Edition, vol. 2. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia.
34. Hilleman, M. 2002. Current overview of the pathogenesis and prophylaxis of measles with focus on practical implications. *Vaccine*. 20:651-665.
- 25 35. Radecke, F., P. Spielhofer, H. Schneider, K. Kaelin, M. Huber, C. Dotsch, G. Christiansen, and M.A. Billeter. 1995. Rescue of measles viruses from cloned DANN. *Embo J*. 14: 5773-5784.
36. Radecke, F., and Billeter. 1997. Reverse genetics meets the nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Reviews in Medical Virology*. 7:49-63.
37. Singh, M., R. Cattaneo, and M.A. Billeter. 1999. A recombinant measles virus expressing hepatitis B virus surface antigen induces humoral immune responses in genetically modified mice. *J. Virol*. 73: 4823-4828.
- 30 38. Spielhofer, P., T. Bachi, T. Fehr, G. Christiansen, R. Cattaneo, K. Kaelin, M. Billeter, and H. Naim. 1998. Chimeric measles viruses with a foreign envelope. *J. Virol*. 72: 2150-2159.
39. Srivastava, I., K. Vandorsten, L. Vojtech, S. Barnett, and L. Stamatou. 2003. Changes in the immunogenic properties of soluble gp140 human immunodeficiency virus envelope constructs upon partial deletion of the second hypervariable region. *J. Virol*. 77:2310-2320.
- 35 40. Parks, C.L., R. A. Lerch, P. Walpita, M.S. Sidhu, and S.A. Udem. 1999. Enhanced measles virus cDNA rescue and gene expression after heat shock. *J. Virol*. 73: 3560-3566.
41. Karber, G. 1931. Breittag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch Exp Path Pharmak*. 162: 480-483.
- 40 42. Burrer, R., D. Salmon-Ceron, S. Richert, G. Pancino, G. Spiridon, S. Haessig, V. Roques, F. Barre-Sinoussi, A.M. Aubertin, and C. Moog. 2001. Immunoglobulin G (IgG) and IgA, but also nonantibody factors, account for in vitro neutralization of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 primary isolates by serum and plasma of HIV-infected patients. *J Virol*. 75: 5421-5424.
43. Charneau, P., G. Mirambeau, P. Roux, S. Paulous, H. Buc, and F. Clavel 1994. HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. *J Mol Biol*. 241:651-662.
- 45 44. Coeffier, E., J. Clement, V. Cussac, N. Khodaei-Boorane, M. Jehanno, M. Rojas, A. Dridi, M. Latour, R. El Habib, F. Barré-Sinoussi, M. Hofnung, and C. Leclerc. 2001. Antigenicity and immunogenicity of the HIV-1 gp41 epitope ELDKWA inserted into permissive sites of the MalE protein. *Vaccine*. 19:684-693.
- 50 45. Mascola, J.R., M.K. Louder, T.C. VanCott, C.V. Sapan, J.S. Lambert, L. R. Muenz, B. Bunow, D.L. Birx, and M.L. Robb. 1997. Potent and synergistic neutralization of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 primary isolates by hyperimmune anti-HIV immunoglobulin combined with monoclonal antibodies 2F5 and 2G12. *J Virol*. 71: 7198-7206.

45. Eckhart, L., W. Raffelberger, B. Ferko, A. Klima, M. Purtscher, H. Katinger, and F. Rüker. 1996. Immunogenic presentation of a conserved gp41 epitope of human immunodeficiency virus type I on recombinant surface antigen of hepatitis B. virus. *J. Gene. Virol.* 77: 2001-2008.
- 5 46. Ho, J., K. MacDonald, and B. Barber. 2002. Construction of recombinant targeting immunogens incorporating an HIV-1 neutralizing epitope into sites of differing conformational constrain. *Vaccine.* 20: 1169-1180.
47. Liang, X., S. Munshi, J. Shendure, Mark, M. Davies, D. Freed, D. Montefiori, and J. Shiver. 1999. Epitope insertion into variable loops of HIV-1 gp120 as a potential means to improve immunogenicity of viral envelope protein. *Vaccine.* 17: 2862-2872.
- 10 48. Jeffs, S., C. Shotton, P. Balfe, and J. McKeating. 2002. Truncated gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus 1 elicits broadly reactive neutralizing immune response. *J. Gen. Virol.* 83: 2723-2732.
49. Kwong, P., and e.al. 2002. HIV evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature.* 420:678-682.
- 15 50. Dilraj, A., F.T. Cutts, J.F. de Castro, J. G. Wheeler, D. Brown, C. Roth, H.M. Coovadia, and J.V. Benett. 2000, *Lancet.* 355:798-803.
51. Desprès et al, 1993. *Virology* 196 : 209-219
52. Mashimo et al. 2002. *PNAS. USA* 99: 11311-11316
53. Lucas et al. 2003. *Immunol. Cell. Biol.* 81(3): 230-6.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> INSTITUT PASTEUR CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
- <120> VIRUS RECOMBINANTES DEL SARAMPIÓN QUE EXPRESAN EPÍTOPES DE ANTÍGENOS DE VIRUS ARN - USO PARA LA PREPARACIÓN DE COMPOSICIONES DE VACUNA
- 25 <130> B05263AAB_01 AD/SL/CAL
- <140> EP 10
- <141> 20-06-2003
- 30 <150> EP02291550.8
- <151> 20-06-2002
- <160> 43
- 35 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 30
- <212> ADN
- 40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 1

5 tatcgtacga tgagagtgaa ggagaaatat 30

<210> 2

<211> 30

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

15 <400> 2

atagcgcgca tcacaagaga gtgagctcaa 30

<210> 3

<211> 32

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

25

<400> 3

tatgcgcgct tatcttatat accacagcca gt 32

<210> 4

30 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 4

ataagacatt caatggatca ggac 24

<210> 5
 <211> 48
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
 10

<400> 5
 tgcccattta tccaattctg cagcattgtt gttgggtctt gtacaatt 48

<210> 6
 15 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 6
 gataaatggg caagtgctgc aagacaagca cattgtaaca ttgt 44

<210> 7
 25 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 7
 ctactcctat tggttcaatt cttta 24
 35

<210> 8
 <211> 11

ES 2 632 723 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 8

Ala Ala Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Ala Ala
1 5 10

10

<210> 9

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 9

20 atttaaagta acacagagtg gggtaattt 30

<210> 10

<211> 42

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

30 <400> 10

gttactttaa attgtaacac ctcaagtcatt acacaggcct gt 42

<210> 11

<211> 30

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 11

5 ttgcataaaa tgctctccct ggcctatag 30

<210> 12

<211> 33

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

15 <400> 12

tatcgtacga tgcgagtcgt gattgcccta ctg 33

<210> 13

<211> 30

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

25

<400> 13

atagcgcgct tatgtgttga tgccaaccca 30

<210> 14

30 <211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 14

ES 2 632 723 T3

tatcgtacga tgagaaacat gacaatgtcc 30

<210> 15

<211> 32

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 15

atagcgcgct taatggcttt catgcgtttt cc 32

<210> 16

15 <211> 18967

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencia artificial: Secuencia de nucleótidos completa del plásmido pTM-MVSchw (CNCM I-2889)

<400> 16

ES 2 632 723 T3

gcggccgcta	atagcactca	ctatagggcc	aactttgttt	ggtctgatga	gtccgtgagg	60
acgaaaccg	gagtcaccgg	tcaccaaaca	aagttgggta	aggatagttc	aatcaatgat	120
catcttctag	tgcacttagg	attcaagatc	ctattatcag	ggacaagagc	aggattaggg	180
atatccgaga	tggccacact	ttaaaggagc	ttagcattgt	tcaaaagaaa	caaggacaaa	240
ccacccatta	catcaggatc	cggtgagacc	atcagaggaa	tcaaacacat	tattatagta	300
ccaatccctg	gagattcctc	aattaccact	cgatccagac	ttctggaccg	gttgggtgag	360
ttaattgtaa	acccgatgtg	gagcgggccc	aaactaacag	gggactaat	aggfatatta	420
tccttatttg	tggagtctcc	aggccaattg	attcagagga	tcaccgatga	ccctgacggt	480
agcataaggc	tgtttagaggt	tgtccagagt	gaccagtcac	aatctggcct	taccttcgca	540
tcaagaggta	ccaacatgga	ggtatgagcg	gaccaatact	tttcacatga	tgatccaatt	600
agtatgtatc	aatccagggt	cggatgggtc	gggaacaagg	aaatctcaga	tattgaagtg	660
caagaccctg	agggattcaa	catgattctg	ggtaccatcc	tagcccaaat	ttgggtcttg	720
ctcgaaagg	cggttacggc	cccagacacg	gcagctgatt	cggagctaag	aaggtggata	780
aagtacacc	aacaaagaag	ggtagtgggt	gaattttagat	tggagagaaa	atggttggat	840
gtggtgagga	acaggattgc	cgaggacctc	tccttacgcc	gattcatggt	cgctctaadc	900
ctggatatca	agagaacacc	cggaaacaaa	cccaggatgt	ctgaaatgat	atgtgacatt	960
gatacatata	tcgtagaggc	aggattagcc	agttttatcc	tgactattaa	gtttgggata	1020
gaaactatgt	atcctgctct	tggactgcct	gaatttgcgt	gtgagttatc	cacacttag	1080
tccttgatga	acctttacca	gcaaatgggg	gaaactgcac	cctacatggt	aatcctggag	1140
aactcaattc	agaacaagtt	cagtgcagga	tcataccctc	tgctctggag	ctatgccatg	1200
ggagttagg	tggaacttga	aaactccatg	ggaggttga	actttggccg	atcttacttt	1260
gatccagcat	atthtagatt	agggaagag	atggtaagga	ggtcagctgg	aaaggtcagt	1320
tccacattgg	catctgaact	cggatcact	gccgaggatg	caaggcttgt	ttcagagatt	1380
gcaatgcata	ctactgagga	caagatcagt	agagcggttg	gaccagaca	agcccaagat	1440
tcatttctac	acggtgatca	aagtgagaat	gagctaccga	gattgggggg	caaggaagat	1500
aggaggggtc	aacagagtcg	aggagaagcc	agggagagct	acagagaaac	cggggcccagc	1560
agagcaagtg	atgagagagc	tgcccactct	ccaaccggca	caccctaga	cattgacact	1620
gcaacggagt	ccagccaaga	tccgcaggac	agtctgaagg	cagctgacgc	cctgcttagg	1680
ctgcaagcca	tggcaggaat	ctcgaagaa	caaggctcag	acacggacac	ccctatagtg	1740
tacaatgaca	gaaatcttct	agactaggtg	cgagagccg	agggccagaa	caacatccgc	1800
ctaccatcca	tcattgttat	aaaaaactta	ggaaccaggt	ccacacagcc	gccagcccat	1860
caaccatcca	ctcccacgat	tggagccaat	ggcagaagag	caggcacgcc	atgtcaaaaa	1920
cggactggaa	tgcatccggg	ctctcaaggc	cgagcccac	ggctcactgg	ccatcgagga	1980
agctatggca	gcatggtcag	aaatatcaga	caaccagga	caggagcgag	ccacctgcag	2040
ggaagagaag	gcaggcagtt	cgggtctcag	caaaccatgc	ctctcagcaa	ttggatcaac	2100
tgaaggcgg	gcacctcgca	tccgcggtca	gggacctgga	gagagcgatg	acgacgctga	2160
aactttggga	atcccccaaa	gaaatctcca	ggcatcaagc	actgggttac	agtgttatta	2220
cgtttatgat	cacagcggtg	aagcggttaa	gggaatccaa	gatgctgact	ctatcatggt	2280
tcaatcaggc	cttgatgggtg	atagcaccct	ctcaggagga	gacaatgaat	ctgaaaacag	2340
cgatgtggat	attggcgaac	ctgataccga	gggatatgct	atcactgacc	ggggatctgc	2400
tcccactctc	atggggttca	ggccttctga	tgttgaaact	gcagaaggag	gggagatcca	2460
cgagctcctg	agactccaat	ccagaggcaa	caactttccg	aagcttggga	aaactctcaa	2520
tgttcctccg	cccccgacc	ccggtagggc	cagcacttcc	gggacacca	ttaaaaagg	2580
cacagacg	agattagcct	catttggaac	ggagatcgcg	tccttattga	caggtggtgc	2640
aaccacaatgt	gctcgaaagt	caccctcgga	accatcaggg	ccaggtgcac	ctgccccgaa	2700
tgccccgag	tgtgtgagca	atgccgact	gatacaggag	tggacaccg	aatctggtac	2760
cacaatctcc	ccgagatccc	agaataatga	agaaggggga	gactattatg	atgatgagct	2820

ES 2 632 723 T3

gttctctgat	gtccaagata	ttaaaacagc	cttggcctaa	atacagcagg	ataatcagaa	2880
gataatctcc	aagctagaat	cactgctggt	attgaagggg	gaagttgagt	caattaagaa	2940
gcagatcaac	aggcaaaata	tcagcatatc	caccctggaa	ggacacctct	caagcatcat	3000
gatcgccatt	cctggacttg	ggaaggatcc	caacgacccc	actgcagatg	tcgaaatcaa	3060
tcccgacttg	aaacccatca	taggcagaga	ttcaggccga	gcactggccg	aagttctcaa	3120
gaaacccggt	gccagccgac	aactccaagg	aatgacaaat	ggacggacca	gttccagagg	3180
acagctgctg	aaggaatttc	agctaaagcc	gatcgggaaa	aagatgagct	cagccgtcgg	3240
gtttgttctc	gacacgggcc	ctgcatcagc	cagtgtaatc	cgctccatta	taaaaatccag	3300
ccggctagag	gaggatcgga	agcgttacct	gatgactctc	cttgatgata	tcaaggagc	3360
caatgatctt	gccaagtctc	accagatgct	gatgaagata	ataatgaagt	agctacagct	3420
ccacttacct	gccaacccca	tgccagtcca	cccaactagt	acaacctaaa	tccattataa	3480
aaaacttagg	agcaagtgga	ttgcctccca	aggtccacaa	tgacagagac	ctacgacttc	3540
gacaagtcgg	catgggacat	caaagggctg	atcgctccga	tacaaccac	cacctacagt	3600
gatggcaggg	tggtgcccga	ggtcagagtc	atagatcctg	gtctaggcga	caggaaggat	3660
gaatgcttta	tgtacatggt	tctgtcgggg	gttgttgagg	acagcgattc	cctagggcct	3720
ccaatcgggc	gagcatttgg	gttctcgccc	ttaggtgttg	gcagatccac	agcaaagccc	3780
gaaaaactcc	tcaagagggc	cactgagctt	gacatagttg	ttagacgtac	agcagggctc	3840
aatgaaaaac	tggtgttcta	caacaacacc	ccactaacct	tcctcacacc	ttggagaaag	3900
gtcctaacaa	cagggagtgt	cttcaacgca	aaccaagtgt	gcaatgctgt	taatctgata	3960
ccgctcgata	cccgcagag	gttccgtggt	gtttatatga	gcatcacccg	tcttctggat	4020
aacgggtatt	acaccgttcc	tagaagaatg	ctggaattca	gatcgggtcaa	tgcaagggcc	4080
ttcaacctgc	tggtgaccct	taggattgac	aaggcgatag	gccctgggaa	gatcatcgac	4140
aatacagagc	aacttcttga	ggcaacattt	atggtccaca	tcgggaaact	caggagaaag	4200
aagagtgaag	tctactctgc	cgattattgc	aaaatgaaaa	tcgaaaagat	gggctggtt	4260
tttgcacttg	gtgggatagg	gggcaccagt	cttcacatta	gaagcacagg	caaaatgagc	4320
aagactctcc	atgcacaact	cggttcaag	aagaccttat	gttaccctgt	gatggatatt	4380
aatgaagacc	ttaatcgatt	actctggagg	agcagatgca	agatagtaag	aatccaggca	4440
gttttgcagc	catcagttcc	tcaagaattc	cgcatctacg	acgacgtgat	cataaatgat	4500
gaccaaggac	tattcaaagt	tctgtagacc	gtagtgcaca	gcaatgcccg	aaaacgacc	4560
ccctcacaat	gacagccaga	aggcccggac	aaaaaaagccc	ctccgaaaag	actccacgga	4620
ccaagcgaga	ggccagccag	cagccgacgg	caagcgcgaa	caccaggcgg	ccccagcaca	4680
gaacagccct	gacacaaggc	caccaccagg	caecccaatc	tgcatcctcc	tcgtgggacc	4740
cccagggacc	aacccccaa	gctgcccccg	atccaaacca	ccaaccgcat	ccccaccacc	4800
cccgggaaag	aaacccccag	caattggaag	gccccctccc	ctcttctca	acacaagaag	4860
tccacaaccg	aaccgcacaa	gagaccgagg	tgaccaaac	gcaggcatcc	gactccctag	4920
acagatcctc	tctccccggc	aaactaaaca	aaacttaggg	ccaaggaaca	tacacacca	4980
acagaaccca	gaccccggcc	cacggcgccc	cgcccccaac	ccccgacaac	cagaggggagc	5040
ccccaaccaa	tcccgcgggc	tcccccggtg	cccacaggca	gggacaccaa	ccccgaaca	5100
gacccagcac	ccaaccatcg	acggttcaag	acgggggggc	cccccaaaa	aaagggcccc	5160
agggggccgac	agccagcacc	gcgaggaagc	ccaccacccc	cacacacgac	cacggcaacc	5220
aaaccagaac	ccagaccacc	ctgggccacc	agctcccaga	ctcggccatc	accccgcaga	5280
aaaggaaagg	cacaacccgc	gcaccccagc	cccgatccgg	cggggagcca	ccccaaccca	5340
accagcacc	aagagcgatc	cccgaaggac	ccccgaaccg	caaaggacat	cagtatccca	5400
cagcctctcc	aagtcccccg	gtctctctct	cttctcgaag	ggacaaaaag	atcaatccac	5460
cacacccgac	gacactcaac	tccccacccc	taaaggagac	accgggaatc	ccagaatcaa	5520
gactcatcca	atgtccatca	tgggtctcaa	ggtgaacgtc	tctgccat	tcatggcagt	5580
actgttaact	ctccaaacac	ccaccggtca	aatccattgg	ggcaatctct	ctaagatagg	5640
ggtggtagga	ataggaagtg	caagctacaa	agttatgact	gcttccagcc	atcaatcatt	5700
agtataaaa	ttaatgcca	atataactct	cctcaataac	tgacagagg	tagagattgc	5760
agaatacagg	agactactga	gaacagtttt	ggaaccaatt	agagatgcac	ttaatgcaat	5820
gaccagaat	ataagaccgg	ttcagagtgt	agcttcaagt	aggagacaca	agagatttgc	5880
gggagtatgc	ctggcaggtg	cggccctagg	cgttgccaca	gctgctcaga	taacagccgg	5940
cattgcactt	caccagtcca	tgctgaactc	tcaagccatc	gacaatctga	gagcgagcct	6000
ggaaactact	aatcaggcaa	ttgagacaat	cagacaagca	gggcaggaga	tgatattggc	6060
tgttcagggt	gtccaagact	acatcaataa	tgagctgata	ccgtctatga	accaactatc	6120
ttgtgattta	atcggccaga	agctcgggct	caaattgtctc	agatactata	cagaatctct	6180
gtcattattt	ggccccagtt	tacgggaccc	catatctgcg	gagatatcta	tccaggtttt	6240
gagctatgcg	cttggaggag	acatcaataa	ggtgttagaa	aagctcggat	acagtggagg	6300
tgatttactg	ggcatcttag	agagcggagg	aataaaggcc	cgataactc	acgtcgacac	6360
agagtcctac	ttcattgtcc	tcagatagc	ctatccgacg	ctgtccgaga	ttaagggggt	6420
gattgtccac	cggctagagg	gggtctcgta	caacataggc	tctcaagagt	ggtataccac	6480
tgtgcccaag	tatgttgcaa	ccccagggta	ccttatctcg	aattttgatg	agtcacgtg	6540
tactttcatg	ccagagggga	ctgtgtgcag	ccaaaaatgcc	ttgtaccgga	tgagtctctc	6600
gctccaagaa	tgctccggg	ggtacaccaa	gtcctgtgct	gtacactcg	tatccggggtc	6660
ttttgggaac	cggttcattt	tatcacaagg	gaaccttaata	gccaatgtg	catcaatcct	6720
ttgcaagtgt	tacacaacag	gaacgatcat	taatcaagac	cctgacaaga	tcctaacata	6780
cattgctgcc	gatcactgcc	ggtagtcga	ggtgaacggc	gtgaccatcc	aaagtcgggag	6840
caggaggtat	ccagacgctg	tgtacttgca	cagaattgac	ctcggctctc	ccataatcatt	6900
ggagaggttg	gacgtagggg	caaatctggg	gaatgcaatt	gctaagtggg	aggatgcca	6960

ES 2 632 723 T3

ggaattgttg gagtcatcgg accagatatt gaggagtatg aaaggtttat cgagcactag 7020
 catagtctac atcctgattg cagtgtgtct tggagggttg atagggatcc cgcctttaat 7080
 atgttgctgc agggggcggt gtaacaaaaa gggagaacaa gttggtatgt caagaccagg 7140
 cctaagcct gatcttacgg gaacatcaaa atcctatgta aggtcgctct gatcctctac 7200
 aactcttgaa acacaaatgt cccacaagtc tcctcttcgt catcaagcaa ccaccgcacc 7260
 cagcatcaag cccacctgaa attatctccg gcttccctct ggccgaacaa tatcggtagt 7320
 taatcaaaac ttagggtgca agatcatcca caatgtcacc acaacgagac cggataaaatg 7380
 ccttctacaa agataacccc catcccaagg gaagtaggat agtcattaac agagaacatc 7440
 ttatgattga tagaccttat gttttgctgg ctgttctggt tgatcatggt agcattctac 7500
 tcataaaaag agccattgca ggcattagac ttcatcgggc agccatctac accgcagaga 7560
 acgtgctgac cctcagcacc aatctagatg taactaactc aatcgagcat caggctcaagg 7620
 gattcactga cctagtgaaa ttaatctctg gtagtgaagt gggcctgagg acacctcaga 7680
 agtacgactt cagagatctc acttggtgta tcaacccgcc acaagattaa attccttaat cgggataggg 7740
 atgtacaata ctgtgcagat gtggctgctg aagagctcat gaatgcattg ggtcctgatt 7800
 ctctactgga gaccagaaca accaactcag tcctagctgt ctcaaaggga aactgctcag 7860
 ggcccactac aatcagaggt caattctcaa acatgtcgtc gtccctgtta gacttgtatt 7920
 taggtcgagg ttacaatgtg tcactatag tcaactatag atccccagga atgtatgggg 8040
 gaactaacga agtggaaaag cctaactcga gcagcaaaag gtcagagttg tcacaatctc 8100
 gcatgtaccg agtgtttgaa gtaggtgtta tcagaaaatc ggggtttggg gctccggtgt 8160
 tccatgatgac aaactatctt gagcaaccag tcagtaatga tctcagcaac tctcagcaac 8220
 ctttggggga gctcaaactc gcagcccttt gtcacgggga agattctatc acaattcctt 8280
 atcagggatc agggaaaagg gtcagcttcc agctcgtaaa gctagggtgc tggaaatccc 8340
 caaccgacat gcaatctgg gtcctcttat caacggatga tccagtgata gacaggcttt 8400
 acctctcatc tcacagaggt gttatcgtcg acaatcaagc aaaatgggct gtccccgaca 8460
 caccaacaga tgacaagtgt cgaatggaga catgcttcca acagggctgt aagggtaaaa 8520
 tccaagcact ctgagagaat cccgagtggt caccattgaa ggataacagg attccttcat 8580
 acggggcttt gtctgttgat ctgagctcga caggttgacc cagttgagct taaaaataaa 8640
 gattcggggc attgatcaca cacggttcag gtagtgacct atacaatcc aaccacaaca 8700
 atgtgtattg gctgactatc ccgccaatga agaacctagc cttaggtgta atcaacacat 8760
 tggagtggat accgagattc aaggttagtc cctacctctt cactgtccca attaagggaag 8820
 caggcgaaga ctgccatgcc ccaacatacc tacctgcgga ggtggatggt gatgtcaaac 8880
 tcagttccaa tctggtgatt ctacctggtc aagatctcca atatgttttg gcaacctacg 8940
 atacttccag ggttgaacat gctgtggttt attacgttta cagcccaagc cgctcatttt 9000
 cttactttta tccttttagg ttgcctataa aggggggtccc catcgaatta caagtggaa 9060
 gcttcacatg ggacaaaaa ctctggtgcc gtcacttctg tgtgcttgcg gactcagaat 9120
 ctggtggaca tatcactcac tctgggatgg tgggcatggg agtcagctgc acagtcaccc 9180
 gggaagatgg aaccaatcgc agataggctc gctagtgaac caatcacatg atgtcacca 9240
 gacatcaggc ataccacta gtgtgaaata gacatcagaa ttaagaaaaa cgtagggtcc 9300
 aagtgttcc cgttatgga ctgcgtatct gtcaaccaga tcttatacc tgaagttcac 9360
 cagatagag caataagata gtagccatcc ttagcagacc tggagtatgc tgcagacca 9420
 cacgcttaca gcctggagga cctacactg tgtcagaaca tcaagcaccg cctaaaaaac 9480
 ggattttcca accaaatgat tataaacaat gtggaagttg ggaatgtcat caagtccaag 9540
 aacatagaag acaaagagtc aacgaggaag atccgtgaac attgtaatca ggatttattt 9600
 ctgtactcca aagtcagtga taaggttttc caatgcttaa tccctaaaaa ggggaatttc 9660
 ggcctaggct ccgaattgag ggaggacatc aaggagaaag gggacactaa ctcacggctt 9720
 atgcacagct cccagtggtt tgagcccttt aagggagaa gttattaactt gggagttac 9780
 aggtcagtga ttaaatacaca aacccatact ctgttttggt ttacagtcaa gactgagatg 9840
 ttcactggta gttcagttga gttgctaact tgccatagga ggagacacac acctgtattc 9900
 gagtctcaac atgtatatta cctgacattt tctcgtgacc ttgttgctat aatcagtaaa 9960
 gaggggaggt taatgacaga cctgacattt gaactgggtt tgatgtattg tgatgtcata 10020
 ggaagagtca gatacatgtg gaccgctatg actatigtat ctaggatatac agagcttcta 10080
 acttatcaaa ttgtagccat gaaactgata gatggtttct tccctgcact cgggaatcca 10140
 ataacagtag aactcagagg gctggagcct cttcacttg gctgaggat gctgaggat 10200
 cttgaccaaa acctcagagg tgctttcctt aaccactgct ttactgaaat acatgatgtt 10260
 tacattttca taactgatga tgatgaaggt acttatcatg agttactga agctctagat 10320
 ttcggccacc ccagacttga catacatctg acaggggaga ttttctcatt tttcagaagt 10380
 cagcctaaaag tcattgtgta agcagtaacg gctgctgaaa atgttaggaa atacatgaat 10440
 ataatacaag gctatcgtga tgagactctg atgaaaggtc atgccatatt ttgtggaatc 10500
 catgctgcag acacaatccg caggcacgga ggcagttggc caccgctgac cctccccctg 10560
 tgcgttgata actgaaatc gaatgctcaa gcttcagggt aagggttaac acatgagcag 10620
 ctggatagtg atctgacaat ttttgctgga gtgaaatttg gctgctttat gcctcttagc 10680
 tggattcag tttaccgaa gtacctaag gacaaggcac ttgctgtctt ccaaaggaa 10740
 cggaggcttg tagatgtttt ccttaatgat cgttacgacc ctcccaaggg aaccgggtca 10800
 tatgttgtaa gttgagctta cctccatgac tcgagctttg acccatatga tgtgataatg 10860
 gaaaaggaga tcaaggaaac aggtagactt cctgagttca acctgtctta cagcctgaa 10920
 tgccaagtga ttgctgaaaa tctaatactca tttgctaaaa tgacttacia aatgagggca 10980
 gggatggcca aggatgagca cgatttgact aaggcactcc gcaaatattt taaggacaat 11040
 acactctagc tgtctcagga 11100

ES 2 632 723 T3

gtcccaaaag atctcaaaaga aagtcacagg gggggggccag tcttaaaaac ctactcccga 11160
agcccgatcc acacaagtac caggaacgtg agagcagcaa aagggtttat aggggttccct 11220
caagtaattc ggcaggacca agacactgat catccggaga atatggaagc ttacgagaca 11280
gtcagtgcat ttatcacgac tgatctcaag aagtactgcc ttaattggag atatgagacc 11340
atcagcttgt ttgcacagag gctaaatgag atttacggat tgcctcatt ttccagtg 11400
ctgcataaga ggcttgagac ctctgtcctg tatgtaagt accctcattg cccccccgac 11460
cttgacagccc aaattccggt atataaagtc cccaatgatk ccaatctcat taagtaccct 11520
atgggaggta tagaagggtt ttgtcagaag ctgtggacca tcagcaccat tccctatcta 11580
tacctggctg cttatgagag cggagtaagg attgcttctg tagtgcaagg ggacaatcag 11640
accatagccc taacaaaag ggtacccagc acatggccct acaaccttaa gaaacgggaa 11700
gctgctagag taactagaga ttactttgta attcttaggc aaaggctaca tgatattggc 11760
catcacctca aggcaaatga gacaattggt tcatcacatt tttttgtcta tcaaaaagga 11820
atatattatg atgggctact tgtgtcccaa tcaactcaaga gcatcgcaag atgtgtattc 11880
tggtcagaga ctatagtga tgaacaagg gcagcatgca gtaatattgc tacaacaatg 11940
gctaaaagca tcgagagagg ttatgaccgt taccttgcat attccctgaa cgctctaaaa 12000
gtgatacagc aaattctggt ctctcttggc ttcacaatca attcaaccat gaaccggat 12060
gtagtacata cctcctcac aaacaacgac ctcttaataa ggatggcact gttgccgct 12120
cctattgggg ggatgaatta tctgaatatg agcaggctgt ttgtcagaaa catcggtgat 12180
ccagtaacct catcaattgc tgaictcaag agaattgatt tgcctcact aatgcctgaa 12240
gagaccctcc atcaagtaat gacacaacaa cggggggact ctctattcct agactgggct 12300
agcgaccctt actcagcaaa tcttgtatgt gtccagagca tcactagact cctcaagaac 12360
ataactgcaa ggtttgtcct gatccatagt ccaaaccctaa tgttaaaagg attattcct 12420
gtgacagta agaaagagga cgggacttcc gcggcattcc tcatggacag gcatattata 12480
gtacctaggg cagctcatga aatcctggat catagtgtca caggggcaag agagtctatt 12540
gcaggcatgc tggataccac aaaaggcttg attcagacca gcatgaggaa ggggggggta 12600
accctctcag cgataaccag attgtccaat tatgactatg aacaattcag agcaggggat 12660
gtgtatttga caggaagaaa gagaaatgtc ctcattgaca aagagtcag ttcagtgca 12720
ctggcgagag ctctaagaag ccatatgtgg gcgaggctag ctcgaggacg gcctatttac 12780
ggccttgagg tccctgatgt actagaatct atgctgagcc accttattcg gctcatgag 12840
acatgtgtca tctgcgagtg tggatcagtc aactacggat gggtttttgt cccctcgggt 12900
tgccaactgg atgatattga caaggaaaca tcactcctga gagtcccata tattggttct 12960
accactgatg agagaacaga catgaaagctt gcctctgtaa gagccccaaag tcgatccttg 13020
cgatctgctg ttagaatagc aacagtgtac tcatgggctt acgggtgatga tgatagctct 13080
tggaacgaag cctggttgtt ggctaggcaa agggccaatg tgagcctgga ggagctaaagg 13140
gtgatcactc ccatctcaac ttcgactaat tttagcgata ggttgagggg tctgtagact 13200
caagtgaat actcaggtac atcccttgtc cgagtggcga ggtataccac aatctccaac 13260
gacaatctct catttgtcat atcagataag aaggttgata ctaactttat ataccaacaa 13320
ggccttgagg tagggttggg tgttttagaa gactcgagaa gactcgagaa 13380
tcatctaaca cggatttaca tcttcacgtc gaaacagatt gttgctgtat cccgatgata 13440
gatcatccca ggataccag ctcccgcgaag cttagagctga gggcagagct atgtaccac 13500
ccattgatat atgataatgc accttttaatt gagcagatg caacaaggct ataccaccag 13560
agccatagga ggcaccttgt ggaatttgtt acatgggtcca caccctact atatcactt 13620
ttagctaagt ccacagcact atctatgatt gacctggtaa caaaatttga gaaggacct 13680
atgaatgaaa tttcagctct cataggggat gagcatatca atagtttcat aactgagttt 13740
ctgctcatag agccaagatt attcactatc tacttgggccc agtgtgctggc catcaattgg 13800
gcatttgatg tacattatca tagaccatca gggaaatata agatgggtga gctgttgc 13860
tcgttccctt ctagaatgag caaaggagtg ttttaaggtgc ttgtcaatgc tctaagcca 13920
ccaaagatct acaagaaatt ctggcattgt ggtattatag agcctatcca tggctcctca 13980
cttgatgctc aaaacttgca cacaactgtg tgcaacatgg tttacacatg ctatatgacc 14040
tacctcgacc tgttgttgaa tgaagagtta gaagagttca cattedtctt gtgtgaaagc 14100
gacgaggatg tagtaccgga cagattcgac aacatccagg caaaacactt atgtgtctg 14160
gcagatttgt actgtcaacc agggacctgc ccaccaattc gaggtctaag accggtagag 14220
aaatgtgcag ttctaaccga ccatatcaag gcagaggcta tgttatctcc agcaggatct 14280
tcgtggaaca taaatccaat tattgtagac cattaactcat gctctctgac ttatctccg 14340
cgaggatcga tcaaacagat aagattgaga gttgatccag gattcatttt cgacgcccct 14400
gctgaggtaa atgtcagtca gccaaagatc ggcagcaaca acatctcaaa tatgagcatc 14460
aaggctttca gaccccaca cgatgatgtt gcaaaattgc tcaaagatat caacacaagc 14520
aagcacaatc ttcccatttc agggggcaat ctgcaccaat atgaaatcca tgctttccgc 14580
agaatcgggt tgaactcatc tgcctgtctac aaagctggtg agatatcaac attaattagg 14640
agatgccttg agccagggga ggacggcttg ttcctgggtg agggatcggg ttctatgtg 14700
atcacttata aagagatact taaactaaac aagtgcctct ataatagtgg ggtttccgcc 14760
aattctagat ctggtcaaag ggaattagca ccctatccct cccaagttgg cctgtctgaa 14820
cacagaatgg gagtaggtaa tattgtcaaa gtgctcttta acgggagcc cgaagtcacg 14880
tgggtaggca gtgtagattg cttcaatttc atagttagta atatccctac ctctagtgtg 14940
gggtttatcc attcagatat agagaccttg cctgacaaag atactataga gaagctagag 15000
gaattggcag ccactctatc gatggctctg ctctgggca aaataggatc aatctgggtg 15060
attaagctta tgcctttcag cggggatttt gttcagggat ttataagtta tgtagggctc 15120
cattatagag aagtgaacct tgtataccct agatcacgca acttcatctc tactgaatct 15180
tatttggtta tgacagatct caaggctaac cggctaatga atcctgaaaa gattaagcag 15240

ES 2 632 723 T3

cagataattg aatcatctgt gaggacttca cctggactta taggtcacat cctatccatt 15300
aagcaactaa gctgcataca agcaattgtg ggagacgcag ttagtagagg tgatatcaat 15360
cctactctga aaaaacttac acctatagag caggtgctga tcaattgcgg gttggcaatt 15420
aacggacctt agctgtgcaa agaattgatc caccatgatg ttgcctcagg gcaagatgga 15480
ttgcttaatt ctatactcat CCTctacagg gagttggcaa gattcaaaaga caaccaaaaga 15540
agtcaacaag ggatgttcca cgcttaccct gtattggtaa gtagcaggca acgagaactt 15600
atatctagga tcacccgcaa attctggggg cacattcttc ttactccgg gaacaaaaag 15660
ttgataaata agtttatcca gaatctcaag tccggctatc tgatactaga cttacaccag 15720
aatatcttcg ttaagaatct atccaagtca gagaacacaga ttattatgac gggggggttg 15780
aaacgtgagt gggtttttaa ggtaacagtc aaggagacca aagaatggta taagttagtc 15840
ggatacagtg ccctgattaa ggactaattg gttgaactcc ggaaccctaa tcctgcctta 15900
gggtggttagg cattatattgc aatatattaa agaaaacttt gaaaatacga agtttctatt 15960
cccagctttg tctggtggcc ggcatggtcc cagcctcctc gctggcgccg gctgggcaac 16020
attccgaggg gaccgtcccc tccgtaattgg cgaatgggac gccggccgatc cggctgctaa 16080
caaagccgga aaggaagctg agttggctgc tgccaccgct gagcaataac tagcataacc 16140
ccttggggcc tctaaacggg tcttgagggg ttttttgctg aaaggaggaa ctatatccgg 16200
atgcygcgca gggccctatg gtaccagctt tttgtccct ttagtggagg ttaattccga 16260
gcttggcgtg atcatgggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa ttggtatccg ctcacaattc 16320
cacacaacat aggagccgga agcataaagt gtaaagcctg ggggtgcctaa tgagttaggt 16380
aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgtcgtgcc 16440
agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg gtgagggcgg ttgctgtatt gggcgtcctt 16500
ccgcttcttc gctcactgac tccgtgcgct cggctgctc gctgcggcga gccggtatcag 16560
ctcactcaaa ggcggtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaagaaca 16620
tgtgagcaaa agccagcaaa aagccgctttt ggcgcgcttg ctggcgtttt 16680
tccataggct cggccccctt gacgagcatc acaaaaaatc acgctcaagt cagaggtggc 16740
gaaaccgcag aggactataa agataccagg cgttccccct tgggaagctcc ctcgtgctg 16800
ctcctgttcc gaccctgccc cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg 16860
tggcgttttc tcaatgctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtctca 16920
agctgggctg tgtgcacgaa cccccgctt agcccgaccg ctgctcctta tccgtaact 16980
atcgctctga gtccaaccgg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta 17040
acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcittgaa tggtggccta 17100
actacggcta cactagaagg acagtatctg gtatctgctc tctgctgaag ccagttacct 17160
tcggaaaaaa agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaaac caccgctggt agcggttgggt 17220
ttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga 17280
tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaaact acgttaaggg attttggta 17340
tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaaa ttaaaaaatg agttttaaat 17400
caactaaagg tatatatgag taaacttggg ctgacagtta ccaatgctta atcagttagg 17460
cacctatctc acgcatctgt ctatttcggt ctatctagat gcctgactg tgcctgactg 17520
agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg ataccgcgag 17580
accacagctc accggctcca gattttatcag caataaacca gccagccgga agggccgagc 17640
gcagaaagtg tctgcaact ttatccgctt ccatccagtc tattaattgt tgccgggaag 17700
ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaactg tgttgccatt gctacaggca 17760
tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggatgg cttcattcag ctccggttcc caacgatcaa 17820
ggcgagttac atgatcccc atgtttgtaa aaaaagcggg tagctccttc ggtcctcca 17880
tcgtttgtag agtaagttg gccgcagtgt tatcactcat gcttatggca gcaactgata 17940
attctcttac tgcatagcca tccgtaagat gcttttctgt gactgggtgag tactcaacca 18000
agtcatctct agaatagttg atgcggcgag cgagttgctc ttgcccggcg tcaatacggg 18060
ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtctcat cattggaaaa cgttcttcgg 18120
ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa cccactcgtg 18180
caccactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt tctctgggtg gcaaaaaacag 18240
gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaaataa gggcgacacg gaaatggtga atactcatac 18300
tcttcttttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg agcggataca 18360
tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc gcgcacattt ccccgaagg 18420
tgccactgta aattgtaaac gttaatattt tgttaaaatt cgctgtaaat tttgtttaa 18480
tcagctcatt ttttaaccaa taggcccgaat tcggcaaaat cccttataaa tcaaaagaat 18540
agaccgagat agggttgagt gttgttccag tttggaacaa gactccacta ttaaagaacg 18600
tggactccaa cgtcaaaggg cgaaaaaccg tctatcaggg cgatggcca ctacgtgaac 18660
catcacccta atcaagtttt ttggggtcga ggtgccgtaa agcactaaat cggaaacccta 18720
aagggaagcc ccgatttaga gcttgacggg gaaaagccggc gaacgtggcg agaaaaggaag 18780
ggaagaaagc gaaaggagcg ggcgctaggg cgctggcaag tgtagcggtc acgctcgcg 18840
taaccaccac acccgccgcg cttaatgctc cgctacaggg cgctcccat tcgccattca 18900
ggctgcgcaa ctgttgggaa gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgtatta cgccagccac 18960
cgcggtg 18967

- <210> 17
- <211> 1488
- <212> ADN
- <213> Virus de la fiebre amarilla
- <220>

ES 2 632 723 T3

<221> característica_misc

<222> (1)..(1488)

<223> secuencia del gen Env 17D204 de YFV expresado en MV

5 <400> 17

```

atgagagttg tgtttgtcgt gctattgctt ttgggtggccc cagcttacag cttcaactgc 60
cttggaatga gcaacagaga cttcttggaa ggagtgtctg gagcaacatg ggtggatttg 120
gttctcgaag gcgacagctg cgtgactatc atgtctaagg acaagcctac catcgaatgg 180
aagatgatga atatggaggc ggtcaacctg gcagaggtcc gcagttattg ctattttggct 240
accgtcagcg atctctccac caaagctgcg tgcccgacca tgggagaagc tcacaatgac 300
aaacgtgctg acccagcttt tgtgtgcaga caaggagtgg tggacagggg ctggggcaac 360
ggctgcggat tttttggcaa aggaagcatt gacacatgcg ccaaatttgc ctgctctacc 420
aaggcaatag gaagaacat cttgaaagag aatatcaagt acgaagtggc cttttttgtc 480
catggaccaa ctactgtgga gtcgcacgga aactactcca cacaggttgg agccactcag 540
gcagggagat tcagcatcac tctgctggcg ccttcataca cactaaagct tggagaatat 600
ggagaggtga cagtggactg tgaaccacgg tcagggattg acaccaatgc atactacgtg 660
atgactgttg gaacaaagac gttcttggtc catcgtgagt gttcatgga cctcaacctc 720
ccttggagca gtgctggaag tactgtgtgg aggaacagag agacgttaat ggagtttgag 780
gaaccacacg ccacgaagca gtctgtgata gcattgggct cacaagaggg agctctgcat 840
caagctttgg ctggagccat tctgtgggaa ttttcaagca aactgtcaa gttgacgtcg 900
ggtcatttga agtgtagagt gaagatggaa aaattgcagt tgaaggggaa aacctatggc 960
gtctgttcaa aggctttcaa gtttcttggg actcccgcag acacaggtca cggcactgtg 1020
gtgttggaaat tgcagtacac tggcacggat ggaccttgca aagttcctat ctctgctcagtg 1080
gcttcattga acgacctaac gccagtgggc agatttgtca ctgtcaacct ttttgtttca 1140
gtggccacgg ccaacgctaa ggtcctgatt gaattggaac caccctttgg agactcatac 1200
atagtggtgg gcagaggaga acaacagatc aatcaccatt ggcacaagtc tgggaagcagc 1260
attggcaaaag cttttacaac cacctcaaaa ggagcgcaga gactagccgc tctaggagac 1320
acagcttggg actttggatc agttggaggg gtgttcacct cagttgggaa ggctgtccat 1380
caagtgttcg gaggagcatt ccgctcactg ttcggaggca tgtcctggat aacgcaagga 1440
ttgtctgggg ctctcctgtt gtggatgggc atcaatgctc gtgattaa 1488

```

<210> 18

10 <211> 1488

<212> ADN

<213> Virus de la fiebre amarilla

<220>

15 <221> característica_misc

<222> (1)..(1488)

<223> Gen Env de WNV expresado en MV

<400> 18

20

ES 2 632 723 T3

```

atgagagttg tgtttgtcgt gctattgctt ttgggtggccc cagcttacag cttcaactgc 60
cttggaaatga gcaacagaga cttcttggaa ggagtgtctg gagcaacatg ggtggatttg 120
gttctcgaag gcgacagctg cgtgactatc atgtctaagg acaagcctac catcgatgtg 180
aagatgatga atatggaggc ggtcaacctg gcagaggtcc gcagttattg ctatttggct 240
accgtcagcg atctctccac caaagctgcg tgcccagcca tgggagaagc tcacaatgac 300
aaacgtgctg acccagcttt tgtgtgcaga caaggagtgg tggacagggg ctggggcaac 360
ggctgcggat tatttggcaa aggaagcatt gacacatgcg ccaaatttgc ctgctctacc 420
aaggcaatag gaagaacat cttgaaagag aatatcaagt acgaagtggc catttttgtc 480
catggaccaa ctactgtgga gtcgcacgga aactactcca cacaggttgg agccactcag 540
gcagggagat tcagcatcac tcctgcggcg ccttcataca cactaaagct tggagaatat 600
ggagaggtga cagtggactg tgaaccacgg tcagggattg acaccaatgc atactacgtg 660
atgactgttg gaacaaagac gttcttggtc catcgtgagt ggttcatgga cctcaacctc 720
ccttggagca gtgctggaag tactgtgtgg aggaacagag agacgttaat ggagtttgag 780
gaaccacagc ccacgaagca gctctgtgata gcatttggct cacaagaggg agctctgcat 840
caagctttgg ctggagccat tcctgtggaa ttttcaagca acactgtcaa gttgacgtcg 900
ggtcatttga agtgtagagt gaagatggaa aaattgcagt tgaagggaaac aacctatggc 960
gtctgttcaa aggccttcaa gtttcttggg actcccgcag acacaggtca cggcactgtg 1020
gtgttggaat tgcagtacac tggcacggat ggaccttgca aagttcctat ctcgtcagtg 1080
gcttcattga acgacctaac gccagtgggc agatttggca ctgtcaacc ttttgtttca 1140
gtggccacgg ccaacgctaa ggtcctgatt gaattggaac cacccttgg agactcatac 1200
atagtgggtg ccagaggaga acaacagatc aatcaccatt ggcacaagtc tggaaagcagc 1260
attggcaaaag cctttacaac caccctcaaa ggagcgcaga gactagccgc tctaggagac 1320
acagcttggg actttggatc agttggaggg gtgttcacct cagttgggaa ggctgtccat 1380
caagtgttcg gaggagcatt ccgctcactg ttcggaggca tgtcctggat aacgcaagga 1440

```

ttgctggggg ctctcctgtt gtggatgggc atcaatgctc gtgattaa 1488

<210> 19

5 <211> 1110

<212> ADN

<213> Virus del Nilo occidental

<220>

10 <221> característica_misc

<222> (1)..(1110)

<223> Gen NS1 de WNV expresado en MV

<400> 19

15

```

atgaggtcca tagctctcac gtttctcgca gttggaggag ttctgctctt cctctccgtg 60
aacgtgcacg ctgacactgg gtgtgccata gacatcagcc ggcaagagct gagatgtgga 120
agtggagtgt tcatacacia tgatgtggag gcttggatgg accggtacaa gtattaccct 180
gaaacgccac aaggcctagc caagatcatt cagaaagctc ataaggaagg agtgtgctgg 240
ctacgatcag tttccagact ggagcatcaa atgtgggaag cagtgaagga cgagctgaac 300
actcttttga aggagaatgg tgtggacctt agtgtcgtgg ttgagaaaca ggagggaaatg 360
tacaagtcag cacctaacag cctcaccgcc accacggaaa aattggaaat tggctggaag 420
gcctggggaa agagtatitt atttgcacca gaactcgcga acaacacctt tgtggttgat 480
ggtccggaga ccaaggaatg tccgactcag aatcgcgctt ggaatagctt agaagtggag 540
gattttggat ttggtctcac cagcactcgg atgttcctga aggtcagaga gagcaacaca 600
actgaatgtg actcgaagat cattggaacg gctgtcaaga acaacttggc gatccacagt 660
gacctgtcct attggattga aagcaggctc aatgatacgt ggaagcttga aagggcagtt 720
ctgggtgaag tcaaatcatg tacgtggcct gagacgcata ccttgtgggg cgatggaatc 780
cttgagagtg acttgataat accagtcaca ctggcgggac cacgaagcaa cagcaaatcg 840
agacctgggt acaagacaca aaacagggc ccatgggacg aaggccgggt agagattgac 900
ttcgattact gcccaggaac tacggtcacc ctgagtgaga gctgcggaca cctgtggacct 960
gccactcgca ccaccaCaga gagcggaaag ttgataacag atttggctg caggagctgc 1020
accttaccac cactgcgcta ccaaactgac agcggctgtt ggtatggat ggagatcaga 1080
ccacagagac atgatgaaaa gacctaatga

```

<210> 20

ES 2 632 723 T3

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 20

tatcgtacga tgagagttgt gttgtcgtg cta 33

10

<210> 21

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 21

20 atagcgcgct tagacagcct toccaactga 30

<210> 22

<211> 1380

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de nucleótidos del gen env de WNV

30 <400> 22

ES 2 632 723 T3

```

atgagagttg tgtttgtcgt gctattgctt ttgggtggccc cagcttacag cttcaactgc 60
cttgggaatga gcaacagaga cttcttggaa ggagtgtctg gagcaacatg ggtggatttg 120
gttctcgaag gcgacagctg cgtgactatc atgtctaagg acaagcctac catcgaatgtg 180
aagatgatga atatggaggc ggtcaacctg gcagaggtcc gcagttattg ctatttggct 240
accgtcagcg atctctccac caaagctgcg tgccccacca tgggagaagc tcacaatgac 300
aaacgtgctg acccagcttt tgtgtgcaga caaggagtgg tggacagggg ctgggggcaac 360
ggctgcgat tatttggcaa aggaagcatt gacacatgcg ccaaatttgc ctgctctacc 420
aaggcaatag gaagaacat cttgaaagag aatatcaagt acgaagtggc cttttttgtc 480
catggaccaaa ctactgtgga gtcgcacgga aactactcca cacaggttgg agccactcag 540
gcagggagat tcagcatcac tcctgcgggc ctttcataca cactaaagct tggagaatat 600
ggagaggtga cagtggactg tgaaccacgg tcagggattg acaccaatgc atactacgtg 660
atgactgttg gaacaaagac gttcttggtc catcgtgagt ggttcatgga cctcaacctc 720
ccttggagca gtgctggaag tactgtgtgg aggaacagag agacgttaat ggagtttgag 780
gaaccacacg ccacgaagca gtcgtgata gcatttggct cacaagaggg agctctgcat 840
caagctttgg ctggagccat tcctgtggaa ttttcaagca acactgtcaa gttgacgtcg 900
ggtcatttga agtgtagagt gaagatggaa aaattgcagt tgaagggaaac aacctatggc 960
gtctgttcaa aggccttcaa gtttcttggg actcccgcag acacaggtca cggcactgtg 1020
gtgttggaaat tgcagtacac tggcacggat ggaccttgca aagttcctat ctcgtcagt 1080
gcttcattga acgacctaac gccagtgggc agatttggta ctgtcaaccc ttttgtttca 1140
gtggccacgg ccaacgctaa ggtcctgatt gaatttggaa cacccttgg agactcatac 1200
atagtgggtg gcagaggaga acaacagatc aatcaccatt ggcacaagtc tgggaagcagc 1260
attggcaaaag cctttacaac caccctcaaa ggagcgcaga gactagccgc tctaggagac 1320
acagcttggg actttggatc agttggaggg gtgttcacct cagttgggaa ggctgtctaa 1380

```

<210> 23

<211> 459

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: secuencia de poliproteínas de WNV

10

<400> 23

```

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

```

ES 2 632 723 T3

Gly Ala Thr Gln Ala Gly Arg Phe Ser Ile Thr Pro Ala Ala Pro Ser
 180 185 190
 Tyr Thr Leu Lys Leu Gly Glu Tyr Gly Glu Val Thr Val Asp Cys Glu
 195 200 205
 Pro Arg Ser Gly Ile Asp Thr Asn Ala Tyr Tyr Val Met Thr Val Gly
 210 215 220
 Thr Lys Thr Phe Leu Val His Arg Glu Trp Phe Met Asp Leu Asn Leu
 225 230 235 240
 Pro Trp Ser Ser Ala Gly Ser Thr Val Trp Arg Asn Arg Glu Thr Leu
 245 250 255
 Met Glu Phe Glu Glu Pro His Ala Thr Lys Gln Ser Val Ile Ala Leu
 260 265 270
 Gly Ser Gln Glu Gly Ala Leu His Gln Ala Leu Ala Gly Ala Ile Pro
 275 280 285
 Val Glu Phe Ser Ser Asn Thr Val Lys Leu Thr Ser Gly His Leu Lys
 290 295 300
 Cys Arg Val Lys Met Glu Lys Leu Gln Leu Lys Gly Thr Thr Tyr Gly
 305 310 315 320
 Val Cys Ser Lys Ala Phe Lys Phe Leu Gly Thr Pro Ala Asp Thr Gly
 325 330 335
 His Gly Thr Val Val Leu Glu Leu Gln Tyr Thr Gly Thr Asp Gly Pro
 340 345 350
 Cys Lys Val Pro Ile Ser Ser Val Ala Ser Leu Asn Asp Leu Thr Pro
 355 360 365
 Val Gly Arg Leu Val Thr Val Asn Pro Phe Val Ser Val Ala Thr Ala
 370 375 380
 Asn Ala Lys Val Leu Ile Glu Leu Glu Pro Pro Phe Gly Asp Ser Tyr
 385 390 395 400
 Ile Val Val Gly Arg Gly Glu Gln Gln Ile Asn His His Trp His Lys
 405 410 415
 Ser Gly Ser Ser Ile Gly Lys Ala Phe Thr Thr Thr Leu Lys Gly Ala
 420 425 430
 Gln Arg Leu Ala Ala Leu Gly Asp Thr Ala Trp Asp Phe Gly Ser Val
 435 440 445
 Gly Gly Val Phe Thr Ser Val Gly Lys Ala Val
 450 455

<210> 24

<211> 2046

5

<212> ADN

<213> HIV-1

<400> 24

atgagagtga aggagaaata tcagcacttg tggagatggg ggtggagatg gggcaccatg 60
 ctccctggga tgttgatgat ctgtagtgct acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat 120
 ggggtacctg tgtggagaga agcaaccacc actctatctt gtgcatcaga tgctaaagcc 180
 tatgatacag aggtacataa tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccac agaccccaac 240
 ccacaagaag tagtattggg aaatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaataacatg 300
 gtgatacaga tgcatagaga tataatcagt ttatgggatg aaagcctaaa gccatgtgta 360

10

ES 2 632 723 T3

```

aaattaacc cactctgtgt tactttaaat tgcactaatt tgaatatcac taagaatact 420
actaatctca ctagttagcag ctggggaatg atggagggaag gagaataaaa aaattgctct 480
ttctatatca ccacaagcat aagaaataag gtaaagaaag aatatgcact ttttaataga 540
cttgatgtag taccagtaaa aaatactagt aatactaagt ataggttaat aagttgtaac 600
acctcagtc t tacacaggc ctgtccaaag gtatcctttc agccaattcc catacattat 660
tgtgtccccg ctgggtttgc gatactaaag tgtaacaata agacattcaa tggatcagga 720
ccatgcacaa atgtcagcac agtacaatgt acacatggaa ttaggccagt ggtgtcaact 780
caactgctgt taaatggcag tctagcagaa gaagacatag taattagatc tgaagatttc 840
acagacaatg ttaaaaccat aatagtagcag ctaaataaat ctgtagtaat taattgtaca 900
agacccaaca acaatacaag agaagggtta tctataggac cagggagagc attttatgca 960
agaagaaaca taataggaga tataagacaa gcacattgta acattagtag agcaaaatgg 1020
aataacactt tacaacagat agttataaaa ttaagagaaa aatttaggaa taaaacaata 1080
gcctttaatc aatcctcagg aggggaccca gaaattgtaa tgcacagttt taattgtgga 1140
ggggaaatct tctactgtaa tacagcacia ctgtttaata gtacttggaa tgttgcctgga 1200
gggacaaaatg gcactgaagg aaatgacata atcacactcc aatgcagaat aaaacaaatt 1260
ataaatatgt ggcagaaagt aggaaaagca atgtatgcc ctccatcac agggacaaatt 1320
agatgttcat caaatattac agggctgcta ctaacaagag atggaggtaa tagtactgag 1380
actgagactg agatcttcag acctggagga ggagatatga gggacaattg gagaagtga 1440
ttatataaat ataaagtagt aagaattgaa ccaataggag tagcaccac cagggcaaaag 1500
agaagaacag tgcaaaagaga aaaaagagca gtgggaaatag gagctgtggt ccttgggttc 1560
ttgggagcag caggaagcac tatgggcgca gcgtcagtga cgctgacggt acaggccagg 1620
ctattattgt ctggtatagt gcagcagcag aacaatctgc tgagggctat tgaggcgcaa 1680
cagaatatgt tgcgactcac agtctggggc atcaagcagc tccaggcaag agtcctggct 1740
ctggaaagat acctaaagga tcaacagctc atgggaattt ggggttgctc tggaaaactc 1800
atgtgcacca cttctgtgcc ttggaatggt agttggagta ataaatctgt ggatgatatt 1860
tggataaca tgacctggat ggagtgaggaa agagaaattg acaattacac agactatata 1920
tatgacttac ttgaaaatc gcaaacccaa caagaaaaga atgaaaaaga attattggaa 1980
ttggataaat gggcaagttt gtggaattgg tttgacataa caaactggct gtggtatata 2040
agataa

```

<210> 25

<211> 681

5

<212> PRT

<213> HIV-1

<400> 25

```

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

```

ES 2 632 723 T3

Leu Phe Asn Arg Leu Asp Val Val Pro Val Lys Asn Thr Ser Asn Thr
 180 185 190
 Lys Tyr Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys
 195 200 205
 Pro Lys Val Ser Phe Gln Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Val Pro Ala
 210 215 220
 Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe Asn Gly Ser Gly
 225 230 235 240
 Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro
 245 250 255
 Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Asp
 260 265 270
 Ile Val Ile Arg Ser Glu Asp Phe Thr Asp Asn Val Lys Thr Ile Ile
 275 280 285
 Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Val Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn
 290 295 300
 Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala
 305 310 315 320
 Arg Arg Asn Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser
 325 330 335
 Arg Ala Lys Trp Asn Asn Thr Leu Gln Gln Ile Val Ile Lys Leu Arg
 340 345 350
 Glu Lys Phe Arg Asn Lys Thr Ile Ala Phe Asn Gln Ser Ser Gly Gly
 355 360 365
 Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe
 370 375 380
 Tyr Cys Asn Thr Ala Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Ala Gly
 385 390 395 400
 Gly Thr Asn Gly Thr Glu Gly Asn Asp Ile Ile Thr Leu Gln Cys Arg
 405 410 415
 Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Lys Val Gly Lys Ala Met Tyr
 420 425 430
 Ala Pro Pro Ile Thr Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly
 435 440 445
 Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Ser Thr Glu Thr Glu Thr Glu
 450 455 460
 Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu
 465 470 475 480
 Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Arg Ile Glu Pro Ile Gly Val Ala Pro
 485 490 495
 Thr Arg Ala Lys Arg Arg Thr Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly
 500 505 510
 Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met
 515 520 525
 Gly Ala Ala Ser Val Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Leu Leu Leu Ser
 530 535 540

ES 2 632 723 T3

Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln
 545 550 555 560
 Gln Asn Met Leu Arg Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala
 565 570 575
 Arg Val Leu Ala Leu Glu Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Met Gly
 580 585 590
 Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ser Val Pro Trp
 595 600 605
 Asn Val Ser Trp Ser Asn Lys Ser Val Asp Asp Ile Trp Asn Asn Met
 610 615 620
 Thr Trp Met Glu Trp Glu Arg Glu Ile Asp Asn Tyr Thr Asp Tyr Ile
 625 630 635 640
 Tyr Asp Leu Leu Glu Lys Ser Gln Thr Gln Gln Glu Lys Asn Glu Lys
 645 650 655
 Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asp
 660 665 670
 Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Arg
 675 680

<210> 26

<211> 2610

5

<212> ADN

<213> HIV-1

<400> 26

```

atgagagtga aggagaata tcagcacttg tggagatggg ggtggagatg gggcaccatg 60
ctccttgggg tgttgatgat ctgtagtgtc acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat 120
gggggtaccctg tgtggagaga agcaaccacc actctatttt gtgcatcaga tgctaaagcc 180
tatgatacag aggtacataa tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccacac agaccccaac 240
ccacaagaag tagtattggg aaatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaataacatg 300
gtagatcaga tgcattgagga tataatcagt ttatgggatg aaagcctaaa gccatgtgta 360
aaattaaccc cactctgtgt tactttaaat tgcactaatt tgaatatcac taagaatact 420
actaatctca ctagttagcag ctgggggaatg atggagggaag gagaataaaa aaattgctct 480
ttctatatca ccacaagcat aagaataaag gtaaagaaag aatatgcaat ttttaataga 540
cctgatgtag taccagtaaa aaatactagt aataactaagt ataggttaat aagttgtaac 600
acctcagtc ttaacacaggc ctgtccaaag gtatcctttc agccaattcc catacattat 660
tgtgtcccgg ctgggtttgc gataactaaag tgtaacaata agacattcaa tggatcagga 720
ccatgcacaa atgtcagcac agtacaatgt acacatggaa ttaggccagt ggtgtcaact 780
caactgctgt taaatggcag tctagcagaa gaagacatag taattagatc tgaagatttc 840
acagacaatg ttaaaacccat aatagtagcag ctaaataaat ctgtagtaat taattgtaca 900
agaccacaaca acaatacaag agaaggtta tctataggac caggagagac attttatgca 960
agaagaaaca taataggaga tataagacaa gcacattgta acattagtag agcaaaatgg 1020
aataacactt tacaacagat agttataaaa ttaagagaaa aatttaggaa taaaacaata 1080
gcctttaatc aatcctcagg aggggaccca gaaattgtaa tgcacagttt taattgtgga 1140
ggggaatttt tctactgtaa tacagcacia ctgtttaata gtacttggaa tgttgctgga 1200
gggacaaatg gcactgaagg aaatgacata atcacactcc aatgcagaat aaaacaaatt 1260
ataaatatgt ggcagaaagt aggaaaagca atgtatgccc ctcccatcac aggacaaatt 1320
agatgttcac caaatattac agggctgcta ctaacaagag atggaggtaa tagtactgag 1380
actgagactg agatcttcag acctggagga ggagatatga gggacaattg gagaagtga 1440
ttatataaat ataaagtatg aagaattgaa ccaataggag tagcaccac cagggcaaa 1500
agaagaacag tgcaaaagaga aaaaagagca gtgggaatag gagctgtgtt ccttgggttc 1560
ttgggagcag caggaagcac tatgggcgca gcgtcagtga cgctgacggt acaggccagg 1620
ctattattgt ctggtatagt gcagcagcag aacaatctgc tgagggctat tgaggcgcaa 1680
cagaatattg tgcgactcac agtctggggc atcaagcagc tccaggcaag agtcctggct 1740
ctggaaagat acctaagggg tcaacagctc atgggaattt ggggttgctc tggaaaactc 1800
atttgcacca cttctgtgcc ttggaatggt agttggagta ataaatctgt ggatgatatt 1860
tggaaataca tgacctggat ggagtgggaa agagaaattg acaattacac agactatata 1920
tatgacttac ttgaaaaatc gcaaacccaa caagaaaaga atgaaaaaga attattggaa 1980
    
```

ES 2 632 723 T3

```

ttggataaat gggcaagttt gtggaattgg tttgacataa caaactggct gtggtatata 2040
agattattca taatgatagt aggaggcttg atagggttaa gaatagtttt tgctgtactt 2100
tctatagtaa atagagttag gcagggatat tcaccattat cgtttcagac cctcctccca 2160
gcctcgaggg gacccgacag gcccgaaaga acagaagaag aaggtggaga gagagacaga 2220
gacagatccg gtccatcagt gaacggatcc ttggcactta tctgggacga tctgaggagc 2280
ctgtgcctct tcagctacca ccgcttgaga gacttactct tgattgtaac gaggatttg 2340
gaacttctgg gacgcagggg gtgggaagcc ctcaaatttt ggtggaatct cctacagtat 2400
tggagtcagg aactaaagaa tagtgctggt agcttgctac aatatgggtg gagctatttc 2460
catgaggcgg tccaggccgt ctggagatct gcgacagaga ctcttgcggg cgcgtgggga 2520
gacttatggg agactcttag gagaggtgga agatggatac tcgcaatccc caggaggatt 2580
agacaagggc ttgagctcac tctcttgtga

```

<210> 27

<211> 869

5

<212> PRT

<213> HIV-1

<400> 27

```

Met Arg Val Lys Glu Lys Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp Gly Trp Arg
 1      5      10      15
Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Thr Glu
 20      25      30
Lys Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Arg Glu Ala
 35      40      45
Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu
 50      55      60
Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
 65      70      75      80
Pro Gln Glu Val Val Leu Gly Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
 85      90      95
Lys Asn Asn Met Val Asp Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp
100      105      110
Asp Glu Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr
115      120      125
Leu Asn Cys Thr Asn Leu Asn Ile Thr Lys Asn Thr Thr Asn Leu Thr
130      135      140
Ser Ser Ser Trp Gly Met Met Glu Glu Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser
145      150      155      160
Phe Tyr Ile Thr Thr Ser Ile Arg Asn Lys Val Lys Lys Glu Tyr Ala
165      170      175
Leu Phe Asn Arg Leu Asp Val Val Pro Val Lys Asn Thr Ser Asn Thr
180      185      190
Lys Tyr Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys
195      200      205
Pro Lys Val Ser Phe Gln Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Val Pro Ala
210      215      220
Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe Asn Gly Ser Gly
225      230      235      240
Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro
245      250      255
Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Asp
260      265      270

```

ES 2 632 723 T3

Ile Val Ile Arg Ser Glu Asp Phe Thr Asp Asn Val Lys Thr Ile Ile
 275 280 285
 Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Val Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn
 290 295 300
 Asn Thr Arg Glu Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala
 305 310 315 320
 Arg Arg Asn Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser
 325 330 335
 Arg Ala Lys Trp Asn Asn Thr Leu Gln Gln Ile Val Ile Lys Leu Arg
 340 345 350
 Glu Lys Phe Arg Asn Lys Thr Ile Ala Phe Asn Gln Ser Ser Gly Gly
 355 360 365
 Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe
 370 375 380
 Tyr Cys Asn Thr Ala Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Ala Gly
 385 390 395 400
 Gly Thr Asn Gly Thr Glu Gly Asn Asp Ile Ile Thr Leu Gln Cys Arg
 405 410 415
 Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Lys Val Gly Lys Ala Met Tyr
 420 425 430
 Ala Pro Pro Ile Thr Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly
 435 440 445
 Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Ser Thr Glu Thr Glu Thr Glu
 450 455 460
 Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu
 465 470 475 480
 Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Arg Ile Glu Pro Ile Gly Val Ala Pro
 485 490 495
 Thr Arg Ala Lys Arg Arg Thr Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly
 500 505 510
 Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met
 515 520 525
 Gly Ala Ala Ser Val Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Leu Leu Leu Ser
 530 535 540
 Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln
 545 550 555 560
 Gln Asn Met Leu Arg Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala
 565 570 575
 Arg Val Leu Ala Leu Glu Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Met Gly
 580 585 590
 Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ser Val Pro Trp
 595 600 605
 Asn Val Ser Trp Ser Asn Lys Ser Val Asp Asp Ile Trp Asn Asn Met
 610 615 620
 Thr Trp Met Glu Trp Glu Arg Glu Ile Asp Asn Tyr Thr Asp Tyr Ile
 625 630 635 640

ES 2 632 723 T3

Tyr Asp Leu Leu Glu Lys Ser Gln Thr Gln Gln Glu Lys Asn Glu Lys
 645 650 655
 Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asp
 660 670
 Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Arg Leu Phe Ile Met Ile Val Gly
 675 680 685
 Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Ile Val Asn
 690 700
 Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser Phe Gln Thr Leu Leu Pro
 705 710 715 720
 Ala Ser Arg Gly Pro Asp Arg Pro Glu Gly Thr Glu Glu Glu Gly Gly
 725 730 735
 Glu Arg Asp Arg Asp Arg Ser Gly Pro Ser Val Asn Gly Ser Leu Ala
 740 745 750
 Leu Ile Trp Asp Asp Leu Arg Ser Leu Cys Leu Phe Ser Tyr His Arg
 755 760 765
 Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg Ile Val Glu Leu Leu Gly
 770 775 780
 Arg Arg Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr Trp Trp Asn Leu Leu Gln Tyr
 785 790 795 800
 Trp Ser Gln Glu Leu Lys Asn Ser Ala Val Ser Leu Leu Gln Tyr Gly
 805 810 815
 Trp Ser Tyr Phe His Glu Ala Val Gln Ala Val Trp Arg Ser Ala Thr
 820 825 830
 Glu Thr Leu Ala Gly Ala Trp Gly Asp Leu Trp Glu Thr Leu Arg Arg
 835 840 845
 Gly Gly Arg Trp Ile Leu Ala Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu
 850 855 860
 Glu Leu Thr Leu Leu
 865

<210> 28

<211> 2010

5

<212> ADN

<213> HIV-1

<400> 28

```

atgagagtga aggagaaata tcagcacttg tggagatggg ggtggagatg gggcaccatg 60
ctccttggga tgttgatgat ctgtagtgct acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat 120
ggggctacctg tgtggagaga agcaaccacc actctatfff gtgcatcaga tgctaaagcc 180
tatgatacag aggtacataa tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccacc agacccaac 240
ccacaagaag tagtattggg aaatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaataacatg 300
gtagatcaga tgcattgagg tataatcagt ttatgggatg aaagcctaaa gccatgtgta 360
aaattaaccc cactctgtgt tactttaa atgcactaatt tgaatatcac taagaatact 420
actaatctca ctagttagcag ctggggaatg atggaggaag gagaaataaa aaattgctct 480
ttctatatca ccacaagcat aagaaataag gtaaagaaag aatatgcact ttttaataga 540
cttgatgtag taccagtaaa aaatactagt aatactaagt atagggtta atagggttaac 600
acctcagtca ttacacaggc ctgtccaaag gtatcctttc agccaattcc catacattat 660
tgtgtcccgg ctgggtttgc gatactaaag tgtaacaata agacattcaa tggatcagga 720
ccatgcacaa atgtcagcac agtacaatgt acacatggaa ttaggccagt ggtgtcaact 780
caactgctgt taaatggcag tctagcagaa gaagacatag taattagatc tgaagatttc 840
acagacaatg ttaaaacat aatagtacag ctaaatgaat ctgtagtaat taattgtaca 900
    
```

ES 2 632 723 T3

```

agacccaaca acaatgctgc agaattggat aaatgggcaa gtgctgcaag acaagcacat 960
tgtaacatta gtagagcaaa atggaataac actttacaac agatagttat aaaattaaga 1020
gaaaaattta ggaataaaac aatagccttt aatcaatcct caggagggga cccagaaatt 1080
gtaatgcaca gttttaattg tggaggggaa tttttctact gtaatacagc acaactgttt 1140
aatagtactt ggaatgttgc tggagggaca aatggcactg aaggaaatga cataatcaca 1200
ctccaatgca gaataaaaca aattataaat atgtggcaga aagtaggaaa agcaatgtat 1260
gccccctcca tcacaggaca aattagatgt tcatcaaata ttacagggct gctactaaca 1320
agagatggag gtaatagtac tgagactgag actgagatct tcagacctgg aggaggagat 1380
atgagggaca attggagaag tgaattatat aaatataaag tagtaagaat tgaaccaata 1440
ggagtagcac ccaccagggc aaagagaaga acagtgcaaa gagaaaaaag agcagtgagg 1500
ataggagctg tgttccttgg gttcttggga gcagcaggaa gcaactatgg cgcagcgtca 1560
gtgacgctga cggtacaggc caggctatta ttgtctggtg tagtgcagca gcagaacaat 1620
ctgctgaggg ctattgaggc gcaacagaat atgttgcgac tcacagtctg gggcatcaag 1680
cagctccagg caagagtcct ggctctggaa agatacctaa gggatcaaca gctcatggga 1740
atttgggggt gctctggaaa actcatttgc accacttctg tgccttggaa tgttagttgg 1800
agtaataaat ctgtggatga tatttggaa aacatgacct ggatggagtg gaaagagaa 1860
attgacaatt acacagacta tataatgac ttacttggaa aatcgcaaac ccaacaagaa 1920
aagaatgaaa aagaattatt ggaattggat aaatgggcaa gtttggtaa ttggtttgac 1980
atacaaaact ggctgtggta tataagataa                2010
    
```

<210> 29

<211> 669

5 <212> PRT

<213> HIV-1

<400> 29

```

Met Arg Val Lys Glu5 Lys Tyr Gln His Leu10 Trp Arg Trp Gly Trp Arg15
Trp Gly Thr Met20 Leu Leu Gly Met Leu25 Met Ile Cys Ser Ala30 Thr Glu
Lys Leu Trp35 Val Thr Val Tyr Tyr40 Gly Val Pro Val Trp45 Arg Glu Ala
Thr Thr50 Thr Leu Phe Cys Ala55 Ser Asp Ala Lys Ala60 Tyr Asp Thr Glu
Val His Asn Val Trp Ala70 Thr His Ala Cys Val75 Pro Thr Asp Pro Asn80
Pro Gln Glu Val85 Val Leu Gly Asn Val Thr90 Glu Asn Phe Asn Met95 Trp
Lys Asn Asn Met100 Val Asp Gln Met His105 Glu Asp Ile Ile Ser110 Leu Trp
Asp Glu Ser115 Leu Lys Pro Cys Val120 Lys Leu Thr Pro Leu125 Cys Val Thr
Leu Asn Cys Thr Asn Leu Asn135 Ile Thr Lys Asn Thr140 Thr Asn Leu Thr
Ser Ser Ser Trp Gly Met150 Met Glu Glu Gly Glu155 Ile Lys Asn Cys Ser160
Phe Tyr Ile Thr Thr165 Ser Ile Arg Asn Lys Val170 Lys Lys Glu Tyr Ala175
Leu Phe Asn Arg180 Leu Asp Val Val185 Pro Val Lys Asn Thr Ser190 Asn Thr
Lys Tyr Arg195 Leu Ile Ser Cys Asn200 Thr Ser Val Ile Thr205 Gln Ala Cys
Pro Lys210 Val Ser Phe Gln Pro215 Ile Pro Ile His Tyr220 Cys Val Pro Ala
    
```

ES 2 632 723 T3

Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe Asn Gly Ser Gly
 225 230 235 240
 Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro
 245 250 255
 Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Asp
 260 265 270
 Ile Val Ile Arg Ser Glu Asp Phe Thr Asp Asn Val Lys Thr Ile Ile
 275 280 285
 Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Val Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn
 290 295 300
 Asn Ala Ala Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Ala Ala Arg Gln Ala His
 305 310 315 320
 Cys Asn Ile Ser Arg Ala Lys Trp Asn Asn Thr Leu Gln Gln Ile Val
 325 330 335
 Ile Lys Leu Arg Glu Lys Phe Arg Asn Lys Thr Ile Ala Phe Asn Gln
 340 345 350
 Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn Cys Gly
 355 360 365
 Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ala Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp
 370 375 380
 Asn Val Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Glu Gly Asn Asp Ile Ile Thr
 385 390 395 400
 Leu Gln Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Lys Val Gly
 405 410 415
 Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Thr Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser
 420 425 430
 Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Ser Thr Glu
 435 440 445
 Thr Glu Thr Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn
 450 455 460
 Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Arg Ile Glu Pro Ile
 465 470 475 480
 Gly Val Ala Pro Thr Arg Ala Lys Arg Arg Thr Val Gln Arg Glu Lys
 485 490 495
 Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala
 500 505 510
 Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Val Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg
 515 520 525
 Leu Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala
 530 535 540
 Ile Glu Ala Gln Gln Asn Met Leu Arg Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys
 545 550 555 560
 Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Leu Glu Arg Tyr Leu Arg Asp Gln
 565 570 575
 Gln Leu Met Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr
 580 585 590

ES 2 632 723 T3

Ser Val Pro Trp Asn Val Ser Trp Ser Asn Lys Ser Val Asp Asp Ile
 595 600 605
 Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Glu Arg Glu Ile Asp Asn Tyr
 610 615 620
 Thr Asp Tyr Ile Tyr Asp Leu Leu Glu Lys Ser Gln Thr Gln Gln Glu
 625 630 635 640
 Lys Asn Glu Lys Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp
 645 650 655
 Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Arg
 660 665

<210> 30

<211> 2574

5

<212> ADN

<213> HIV-1

<400> 30

```

atgagagtga aggagaaata tcagcacttg tggagatggg ggtggagatg gggcaccatg 60
ctccttgagg tgttgatgat ctgtagtgtc acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat 120
gggggtaccg tgtggagaga agcaaccacc actctatfff gtgcatcaga tgctaaagcc 180
tatgatacag aggtacataa tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccac agaccccaac 240
ccacaagaag tagtattggg aaatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaataacatg 300
gtagatcaga tgcattgagg tataatcagt ttatgggatg aaagcctaaa gccatgtgta 360
aaattaacc cactctgtgt tactttaaat tgcactaatt tgaatatcac taagaatact 420
actaatctca ctagttagcag ctggggaatg atggaggaag gagaataaaa aaattgctct 480
ttctatatca ccacaagcat aagaaataag gtaaagaaag aatatgcact ttttaataga 540
cttgatgtag taccagtaaa aaatactagt aataactaagt ataggttaat aagttgtaac 600
acctcagtca ttacacaggc ctgtccaag gtatcctttc agccaattcc catacattat 660
tgtgtcccgg ctgggtttgc gatactaaag tgtaacaata agacattcaa tggatcagga 720
ccatgcacaa atgtcagcac agtacaatgt acacatggaa ttaggccagt ggtgtcaact 780
caactgctgt taaatggcag tctagcagaa gaagacatag taattagatc taagtgttct 840
acagacaatg ttaaaaccat aatagtcag cttaaataat ctgtagtaat taattgtaca 900
agacccaaca acaatgctgc agaattggat aaatgggcaa gtgtgcaag acaagcacaat 960
tgtaacatta gtagagcaaa atggaataac actttacaac agatagttat aaaattaaga 1020
gaaaaattta ggaataaaac aatagccttt aatcaatcct caggagggga cccagaaatt 1080
gtaatgcaca gttttaattg tggaggggaa tttttctact gtaatacagc acaactgttt 1140
aatagctact ggaatgttgc tggaggggaca aatggcactg aaggaaatga cataatcaca 1200
ctccaatgca gaataaaaca aattataaat atgtggcaga aagtaggaaa agcaatgtat 1260
gccccctcca tcacaggaca aattagatgt tcatcaataa ttacagggct gctactaaca 1320
agagatggag gtaatagtac tgagactgag actgagatct tcagacctgg aggaggagat 1380
atgaggggaca attggagaag tgaattataa aaatataaag tagtaagaat tgaaccaata 1440
ggagtagcac ccaccagggc aaagagaaga acagtgcata gagaaaaaag agcagtgagg 1500
ataggagctg tgttccttgg gttcttggga gcagcaggaa gcactatggg gcagcgtca 1560
gtgacgctga cggtagaggc caggctatta ttgtctggtg tagtgacgca gcagaacaat 1620
ctgctgaggg ctattgaggc gcaacagaat atgttgcgac tcacagtctg gggcatcaag 1680
cagctccagg caagagtcct ggctctggaa agatacctaa gggatcaaca gctcatggga 1740
atttgggggt gctctggaaa actcatttgc accactctg tgcttggaa tgttagttgg 1800
agtaataaat ctgtggatga tatttggaa aacatgacct ggatggagtg ggaagagaa 1860
attgacaatt acacagacta tataatgac ttacttgaaa aatcgcaaac ccaacaagaa 1920
aagaatgaaa aagaattatt ggaattggat aaatgggcaa gtttgggaa ttggtttgac 1980
atacaaaact ggctgtggta tataagatta ttcataatga tagtaggagg ctgtataggt 2040
ttaagaatag tttttgctgt actttctata gttaaataag ttaggcagg ttaggcagg atattcaca 2100
ttatcgtttc agaccctct cccagcctcg aggggaccg acaggcccga aggaacagaa 2160
gaagaaggtg gagagagaga cagagacaga tccgggtccat cagtgaacgg atccttggca 2220
cttatctggg acgatctgag gagcctgtgc ctcttcagct accaccgctt gagagactta 2280
ctcttgattg taacgaggat tgtggaactt ctgggacgca gggggtggga agccctcaa 2340
tattgggtga atctctaca gtattggagt caggaactaa agaatagtgc tgttagcttg 2400
ctacaataat ggtggagcta ttccatgag gcggtccagg ccgtctggag atctgagca 2460
gagactcttg cgggcgctg gggagactta tgggagactt ttaggagagg tgaagatgg 2520
atactcgcaa tccccaggag gattagacaa gggcttgagc tcactctctt gtga 2574
    
```

10

<210> 31

ES 2 632 723 T3

<211> 857

<212> PRT

<213> HIV-1

5

<400> 31

Met Arg Val Lys Glu Lys Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp Gly Trp Arg
 1 5 10 15
 Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Thr Glu
 20 25 30
 Lys Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Arg Glu Ala
 35 40 45
 Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu
 50 55 60
 Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
 65 70 75 80
 Pro Gln Glu Val Val Leu Gly Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
 85 90 95
 Lys Asn Asn Met Val Asp Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp
 100 105 110
 Asp Glu Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr
 115 120 125
 Leu Asn Cys Thr Asn Leu Asn Ile Thr Lys Asn Thr Thr Asn Leu Thr
 130 135 140
 Ser Ser Ser Trp Gly Met Met Glu Glu Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser
 145 150 155 160
 Phe Tyr Ile Thr Thr Ser Ile Arg Asn Lys Val Lys Lys Glu Tyr Ala
 165 170 175
 Leu Phe Asn Arg Leu Asp Val Val Pro Val Lys Asn Thr Ser Asn Thr
 180 185 190
 Lys Tyr Arg Leu Ile Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys
 195 200 205
 Pro Lys Val Ser Phe Gln Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Val Pro Ala
 210 215 220
 Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe Asn Gly Ser Gly
 225 230 235 240
 Pro Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro
 245 250 255
 Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Asp
 260 265 270
 Ile Val Ile Arg Ser Glu Asp Phe Thr Asp Asn Val Lys Thr Ile Ile
 275 280 285
 Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Val Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn
 290 295 300
 Asn Ala Ala Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Ala Ala Arg Gln Ala His
 305 310 315 320
 Cys Asn Ile Ser Arg Ala Lys Trp Asn Asn Thr Leu Gln Gln Ile Val
 325 330 335
 Ile Lys Leu Arg Glu Lys Phe Arg Asn Lys Thr Ile Ala Phe Asn Gln

ES 2 632 723 T3

			340						345	-		350					
Ser	Ser	Gly	Gly	Asp	Pro	Glu	Ile	Val	Met	His	Ser	Phe	Asn	Cys	Gly		
		355					360					365					
Gly	Glu	Phe	Phe	Tyr	Cys	Asn	Thr	Ala	Gln	Leu	Phe	Asn	Ser	Thr	Trp		
	370					375					380						
Asn	Val	Ala	Gly	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Glu	Gly	Asn	Asp	Ile	Ile	Thr		
385					390					395					400		
Leu	Gln	Cys	Arg	Ile	Lys	Gln	Ile	Ile	Asn	Met	Trp	Gln	Lys	Val	Gly		
				405					410					415			
Lys	Ala	Met	Tyr	Ala	Pro	Pro	Ile	Thr	Gly	Gln	Ile	Arg	Cys	Ser	Ser		
			420					425					430				
Asn	Ile	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Arg	Asp	Gly	Gly	Asn	Ser	Thr	Glu		
		435					440					445					
Thr	Glu	Thr	Glu	Ile	Phe	Arg	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Met	Arg	Asp	Asn		
	450				455						460						
Trp	Arg	Ser	Glu	Leu	Tyr	Lys	Tyr	Lys	Val	Val	Arg	Ile	Glu	Pro	Ile		
465					470					475					480		
Gly	Val	Ala	Pro	Thr	Arg	Ala	Lys	Arg	Arg	Thr	Val	Gln	Arg	Glu	Lys		
				485					490					495			
Arg	Ala	Val	Gly	Ile	Gly	Ala	Val	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly	Ala	Ala		
			500					505					510				
Gly	Ser	Thr	Met	Gly	Ala	Ala	Ser	Val	Thr	Leu	Thr	Val	Gln	Ala	Arg		
		515					520					525					
Leu	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val	Gln	Gln	Gln	Asn	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala		
	530					535					540						
Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	Asn	Met	Leu	Arg	Leu	Thr	Val	Trp	Gly	Ile	Lys		
545					550					555					560		
Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Val	Leu	Ala	Leu	Glu	Arg	Tyr	Leu	Arg	Asp	Gln		
				565					570					575			
Gln	Leu	Met	Gly	Ile	Trp	Gly	Cys	Ser	Gly	Lys	Leu	Ile	Cys	Thr	Thr		
			580					585					590				
Ser	Val	Pro	Trp	Asn	Val	Ser	Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Val	Asp	Asp	Ile		
		595					600					605					
Trp	Asn	Asn	Met	Thr	Trp	Met	Glu	Trp	Glu	Arg	Glu	Ile	Asp	Asn	Tyr		
	610					615					620						
Thr	Asp	Tyr	Ile	Tyr	Asp	Leu	Leu	Glu	Lys	Ser	Gln	Thr	Gln	Gln	Glu		
625					630					635					640		
Lys	Asn	Glu	Lys	Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Asp	Lys	Trp	Ala	Ser	Leu	Trp		
				645					650					655			
Asn	Trp	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Trp	Leu	Trp	Tyr	Ile	Arg	Leu	Phe	Ile		
			660					665					670				
Met	Ile	Val	Gly	Gly	Leu	Ile	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	Phe	Ala	Val	Leu		
		675					680					685					
Ser	Ile	Val	Asn	Arg	Val	Arg	Gln	Gly	Tyr	Ser	Pro	Leu	Ser	Phe	Gln		
	690					695					700						
Thr	Leu	Leu	Pro	Ala	Ser	Arg	Gly	Pro	Asp	Arg	Pro	Glu	Gly	Thr	Glu		

ES 2 632 723 T3

705					710						715				720
Glu	Glu	Gly	Gly	Glu	Arg	Asp	Arg	Asp	Arg	Ser	Gly	Pro	Ser	Val	Asn
				725				730						735	
Gly	Ser	Leu	Ala	Leu	Ile	Trp	Asp	Asp	Leu	Arg	Ser	Leu	Cys	Leu	Phe
			740					745					750		
Ser	Tyr	His	Arg	Leu	Arg	Asp	Leu	Leu	Leu	Ile	Val	Thr	Arg	Ile	Val
		755					760					765			
Glu	Leu	Leu	Gly	Arg	Arg	Gly	Trp	Glu	Ala	Leu	Lys	Tyr	Trp	Trp	Asn
	770					775					780				
Leu	Leu	Gln	Tyr	Trp	Ser	Gln	Glu	Leu	Lys	Asn	Ser	Ala	Val	Ser	Leu
	785				790					795					800
Leu	Gln	Tyr	Gly	Trp	Ser	Tyr	Phe	His	Glu	Ala	Val	Gln	Ala	Val	Trp
				805					810					815	
Arg	Ser	Ala	Thr	Glu	Thr	Leu	Ala	Gly	Ala	Trp	Gly	Asp	Leu	Trp	Glu
			820					825					830		
Thr	Leu	Arg	Arg	Gly	Gly	Arg	Trp	Ile	Leu	Ala	Ile	Pro	Arg	Arg	Ile
		835					840					845			
Arg	Gln	Gly	Leu	Glu	Leu	Thr	Leu	Leu							
	850					855									

<210> 32

<211> 1842

5

<212> ADN

<213> HIV-1

<400> 32

```

atgagagtga aggagaaata tcagcacttg tggagatggg ggtggagatg gggcaccatg 60
ctccttggga tgttgatgat ctgtagtgct acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat 120
ggggtacctg tgtggagaga agcaaccacc actctatittt gtgcatcaga tgctaaagcc 180
tatgatacag aggtacataa tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccac agaccccaac 240
ccacaagaag tagtattggg aaatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaataacatg 300
gtagatcaga tgcattgagg tataatcagt ttatgggatg aaagcctaaa gccatgtgta 360
aaattaacc cactctgigt tactttaaatt tgtaacacct cagtcattac acaggcctgt 420
ccaaaggat cctttcagcc aattcccata cattattgtg tcccggctgg gtttgcgata 480
ctaaagtgt acaataagac attcaatgga tcaggaccat gcacaaatgt cagcacagta 540
caatgtacac atggaattag gccagtgggt tcaactcaac tgctgttaaa tggcagctta 600
gcagaagaag acatagtaat tagatctgaa gatttcacag acaatgttaa aaccataata 660
gtacagctaa atgaatctgt agtaattaat tgtacaagac ccaacaacaa tacaagagaa 720
aggttatcta taggaccagg gagagcattt tatgcaagaa gaaacataat aggagatata 780
agacaagcac attgtaacat tagtagagca aaatggaata acactttaca acagatagtt 840
ataaaattaa gagaaaaatt taggaataaa acaatagcct ttaatcaatc ctcaggaggg 900
gaccagaaa ttgtaatgca cagttttaaatt tggaggggg aatttttcta ctgtaataca 960
gcacaactgt ttaatagtag ttggaatggt gctggaggga caaatggcac tgaagggaaat 1020
gacataatca cactccaatg cagaataaaa caaattataa atatgtggca gaaagttaga 1080
aaagcaatgt atgccctcc catcacagga caaattagat gttcatcaaa tattacaggg 1140
ctgctactaa caagagatgg aggtaatagt actgagactg agactgagat cttcagacct 1200
ggaggaggag atatgagggg caattggaga agtgaattat ataaatataa agtagtaaga 1260
attgaaccaa taggagtagc accaccagg gcaagagaa gaacagtgca aagagaaaaa 1320
agagcagtg gaaataggagc tgtgttcctt ggggttcttg gagcagcagg aagcactatg 1380
ggcgcagct cagtgcgct gacggtagag gccaggctat tattgtctgg tatagtgcag 1440
cagcagaaca atctgctgag ggcatttagc gcgcaacaga atatgttgcg actcacagtc 1500
tggggcatca agcagctcca ggcaagagtc ctggctctgg aaagatacct aagggatcaa 1560
cagctcatgg gaatttgggg ttgctctgga aaactcattt gcaccacttc tgtgccttgg 1620
aatgtagtt ggagtaataa atctgtggat gatatttggg ataacatgac ctggatggag 1680
tgggaaagag aaattgacaa ttacacagac tatatatatg acttacttga aaaatcgcaa 1740
acccaacaag aaaagaatga aaaagaatta ttggaattgg ataaatgggc aagtttgtgg 1800
aattggtttg acataacaaa ctggctgtgg tatataagat ga 1842

```

ES 2 632 723 T3

<210> 33

<211> 613

<212> PRT

<213> HIV-1

5

<400> 33

Met Arg Val Lys Glu Lys Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp Gly Trp Arg
 1 5 10 15
 Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Thr Glu
 20 25 30
 Lys Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Arg Glu Ala
 35 40 45
 Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu
 50 55 60
 Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
 65 70 75 80
 Pro Gln Glu Val Val Leu Gly Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
 85 90 95
 Lys Asn Asn Met Val Asp Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp
 100 105
 Asp Glu Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr
 115 120 125
 Leu Asn Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser
 130 135 140
 Phe Gln Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Val Pro Ala Gly Phe Ala Ile
 145 150 155 160
 Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe Asn Gly Ser Gly Pro Cys Thr Asn
 165 170 175
 Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr
 180 185 190
 Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Asp Ile Val Ile Arg
 195 200 205
 Ser Glu Asp Phe Thr Asp Asn Val Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn
 210 215 220
 Glu Ser Val Val Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu
 225 230 235 240
 Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg Asn Ile
 245 250 255
 Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Arg Ala Lys Trp
 260 265 270
 Asn Asn Thr Leu Gln Gln Ile Val Ile Lys Leu Arg Glu Lys Phe Arg
 275 280 285
 Asn Lys Thr Ile Ala Phe Asn Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile
 290 295 300
 Val Met His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr
 305 310 315
 Ala Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Ala Gly Gly Thr Asn Gly
 325 330 335

ES 2 632 723 T3

Thr Glu Gly Asn Asp Ile Ile Thr Leu Gln Cys Arg Ile Lys Gln Ile
 340 345 350
 Ile Asn Met Trp Gln Lys Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile
 355 360 365
 Thr Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr
 370 375 380
 Arg Asp Gly Gly Asn Ser Thr Glu Thr Glu Thr Glu Ile Phe Arg Pro
 385 390 395 400
 Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr
 405 410 415
 Lys Val Val Arg Ile Glu Pro Ile Gly Val Ala Pro Thr Arg Ala Lys
 420 425 430
 Arg Arg Thr Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Val
 435 440 445
 Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser
 450 455 460
 Val Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Leu Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln
 465 470 475 480
 Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln Asn Met Leu
 485 490 495
 Arg Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala
 500 505 510
 Leu Glu Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Met Gly Ile Trp Gly Cys
 515 520 525
 Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ser Val Pro Trp Asn Val Ser Trp
 530 535 540
 Ser Asn Lys Ser Val Asp Asp Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu
 545 550 555 560
 Trp Glu Arg Glu Ile Asp Asn Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr Asp Leu Leu
 565 570 575
 Glu Lys Ser Gln Thr Gln Gln Glu Lys Asn Glu Lys Glu Leu Leu Glu
 580 585 590
 Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp
 595 600 605
 Leu Trp Tyr Ile Arg
 610

<210> 34

<211> 2406

5

<212> ADN

<213> HIV-1

<400> 34

atgagagtga aggagaaata tcagcacttg tggagatggg ggtggagatg gggcaccatg 60
 ctccitggga tgttgatgat ctgtagtgct acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat 120
 ggggtacctg tgtggagaga agcaaccacc actctatfff gtgcatcaga tgctaaagcc 180
 tatgatacag aggtacataa tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccac agacccaac 240
 ccacaagaag tagtattggg aaatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaataacatg 300
 gtgatcaga tgcattgagga tataatcagt ttatgggatg aaagcctaaa gccatgtgta 360

ES 2 632 723 T3

```

aaattaacc cactctgtgt tactttaaat tgtaaacacct cagtcattac acaggcctgt 420
ccaaaggtat cctttcagcc aattcccata cattattgtg tccccgctgg gtttgcgata 480
ctaaagtgt acaataagac attcaatgga tcaggaccat gcacaaatgt cagcacagta 540
caatgtacac atggaattag gccagtgggt tcaactcaac tgctgttaaa tggcagtcta 600
gcagaagaag acatagtaat tagatctgaa gatttcacag acaatgttaa aaccataata 660
gtacagctaa atgaatctgt agtaattaat tgtacaagac ccaacaacaa tacaagagaa 720
aggttatcta taggaccagg gagagcattt tatgcaagaa gaaacataat aggagatata 780
agacaagcac attgtaacat tagtagagca aaatggaata acactttaca acagatagtt 840
ataaaattaa gagaaaaatt taggaataaa acaatagcct ttaatcaatc ctcaggaggg 900
gaccagaaa ttgtaatgca cagttttaat tgtggagggg aatttttcta ctgtaataca 960
gcacaactgt ttaatagtac ttggaatggt gctggagggg caaatggcac tgaaggaaat 1020
gacataatca cactccaatg cagaataaaa caaattataa atatgtggca gaaagtagga 1080
aaagcaatgt atgccctcc catcacagga caaattagat gttcatcaaa tattacaggg 1140
ctgctactaa caagagatgg agtaatagt actgagactg agactgagat cttcagacct 1200
ggaggaggag atatgagggg caattggaga agtgaattat ataaatataa agtagtaaga 1260
attgaaccaa taggagtagc acccaccagg gcaaagagaa gaacagtgca aagagaaaaa 1320
agagcagtgg gaataggagc tgtgttcctt gggttcttgg gagcagcagg aagcactatg 1380
ggcgagcgt cagtgcgct gacggtagag gccaggctat tattgtctgg tatagtgcag 1440
cagcagaaca atctgctgag ggctattgag gcgcaacaga atatgttgcg actcacagtc 1500
tggggcatca agcagctcca ggcaagagtc ctggctctgg aaagatacct aagggatcaa 1560
cagctcatgg gaatttgggg ttgctctgga aaactcattt gcaccacttc tgtgccttgg 1620
aatgttagtt ggagtaataa atctgtggat gatatttggg ataacatgac ctggatggag 1680
tgggaaagag aaattgacaa ttacacagac tatatatatg acttacttga aaaatcgcaa 1740
acccaacaag aaaagaatga aaaagaatta ttggaattgg ataaatgggc aagtttgtgg 1800
aattggtttg acataacaaa ctggctgtgg tatataagat tattcataat gatagttaga 1860
ggcttgatag gtttaagaat agtttttgcg gtactttcta tagtaaatag agttaggcag 1920
ggatattcac cattatcgtt tcagaccctc ctcccagcct cgaggggacc cgacaggccc 1980
gaaggaacag aagaagaagg tggagagaga gacagagaca gatccggtcc atcagtgaac 2040
ggatccttgg cacttatctg ggacgatctg cggagcctgt gcctcttcag ctaccaccgc 2100
ttgagagact tactcttgat tgaacgagg attgtggaac ttctgggacg caggggggtg 2160
gaagccctca aatattgggtg gaatctccta cagtattgga gtcaggaact aaagaatagt 2220
gctgttagct tgctacaata tgggtggagc tatttccatg aggcggtcca ggccgtctgg 2280
agatctgcga cagagactct tgcgggcgcg tggggagact tatgggagac tcttaggaga 2340
ggtggaagat ggatactcgc aatccccagg aggattagac aagggcttga gctcactctc 2400
ttgtga
    
```

<210> 35

<211> 801

5

<212> PRT

<213> HIV-1

<400> 35

```

Met Arg Val Lys Glu Lys Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp Gly Trp Arg
 1          5          10
Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Thr Glu
          20          25
Lys Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Arg Glu Ala
          35          40          45
Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu
          50          55          60
Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
          65          70          75          80
Pro Gln Glu Val Val Leu Gly Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
          85          90          95
Lys Asn Asn Met Val Asp Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp
          100          105          110
Asp Glu Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr
          115          120          125
Leu Asn Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser
          130          135          140
    
```

ES 2 632 723 T3

Phe Gln Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Val Pro Ala Gly Phe Ala Ile
 145 150 155 160
 Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe Asn Gly Ser Gly Pro Cys Thr Asn
 165 170 175
 Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr
 180 185 190
 Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Asp Ile Val Ile Arg
 195 200 205
 Ser Glu Asp Phe Thr Asp Asn Val Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn
 210 215 220
 Glu Ser Val Val Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Glu
 225 230 235 240
 Arg Leu Ser Ile Gly Pro Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Arg Arg Asn Ile
 245 250 255
 Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Arg Ala Lys Trp
 260 265 270
 Asn Asn Thr Leu Gln Gln Ile Val Ile Lys Leu Arg Glu Lys Phe Arg
 275 280 285
 Asn Lys Thr Ile Ala Phe Asn Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile
 290 295 300
 Val Met His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr
 305 310 315 320
 Ala Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Ala Gly Gly Thr Asn Gly
 325 330 335
 Thr Glu Gly Asn Asp Ile Ile Thr Leu Gln Cys Arg Ile Lys Gln Ile
 340 345 350
 Ile Asn Met Trp Gln Lys Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile
 355 360 365
 Thr Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr
 370 375 380
 Arg Asp Gly Gly Asn Ser Thr Glu Thr Glu Thr Glu Ile Phe Arg Pro
 385 390 395 400
 Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr
 405 410 415
 Lys Val Val Arg Ile Glu Pro Ile Gly Val Ala Pro Thr Arg Ala Lys
 420 425 430
 Arg Arg Thr Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Val
 435 440 445
 Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser
 450 455 460
 Val Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Leu Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln
 465 470 475 480
 Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln Asn Met Leu
 485 490 495
 Arg Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala
 500 505 510

ES 2 632 723 T3

Leu Glu Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Met Gly Ile Trp Gly Cys
 515 520 525
 Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ser Val Pro Trp Asn Val Ser Trp
 530 535 540
 Ser Asn Lys Ser Val Asp Asp Ile Trp Asn Asn Met Thr Trp Met Glu
 545 550 555 560
 Trp Glu Arg Glu Ile Asp Asn Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr Asp Leu Leu
 565 570 575
 Glu Lys Ser Gln Thr Gln Gln Glu Lys Asn Glu Lys Glu Leu Leu Glu
 580 585 590
 Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp
 595 600 605
 Leu Trp Tyr Ile Arg Leu Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly
 610 615 620
 Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Ile Val Asn Arg Val Arg Gln
 625 630 635 640
 Gly Tyr Ser Pro Leu Ser Phe Gln Thr Leu Leu Pro Ala Ser Arg Gly
 645 650 655
 Pro Asp Arg Pro Glu Gly Thr Glu Glu Glu Gly Gly Glu Arg Asp Arg
 660 665 670
 Asp Arg Ser Gly Pro Ser Val Asn Gly Ser Leu Ala Leu Ile Trp Asp
 675 680 685
 Asp Leu Arg Ser Leu Cys Leu Phe Ser Tyr His Arg Leu Arg Asp Leu
 690 695 700
 Leu Leu Ile Val Thr Arg Ile Val Glu Leu Leu Gly Arg Arg Gly Trp
 705 710 715 720
 Glu Ala Leu Lys Tyr Trp Trp Asn Leu Leu Gln Tyr Trp Ser Gln Glu
 725 730 735
 Leu Lys Asn Ser Ala Val Ser Leu Leu Gln Tyr Gly Trp Ser Tyr Phe
 740 745 750
 His Glu Ala Val Gln Ala Val Trp Arg Ser Ala Thr Glu Thr Leu Ala
 755 760 765
 Gly Ala Trp Gly Asp Leu Trp Glu Thr Leu Arg Arg Gly Gly Arg Trp
 770 775 780
 Ile Leu Ala Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly Leu Glu Leu Thr Leu
 785 790 795 800
 Leu

<210> 36

<211> 1807

5

<212> ADN

<213> HIV-1

<400> 36

atgagagtga aggagaaata tcagcacttg tggagatggg ggtggagatg gggcaccatg 60
 ctccttggga tgttgatgat ctgtagtgt acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat 120
 ggggtacctg tgtggagaga agcaaccacc actctatttt gtgcatcaga tgctaaagcc 180

ES 2 632 723 T3

```
tatgatacag aggtacataa tgtttgggcc acacatgcct gtgtacccac agaccccaac 240
ccacaagaag tagtattggg aaatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaataacatg 300
gtagatcaga tgcattgagga tataatcagt ttatgggatg aaagcctaaa gccatgtgta 360
aaattaaccc cactctgtgt tactttaaat tgtaacacct cagtcattac acaggcctgt 420
ccaaaggtat cctttcagcc aattcccata cattattgtg tcccggctgg gtttgcgata 480
ctaaagtgt acaataagac attcaatgga tcaggaccat gcacaaatgt cagcacagta 540
caatgtacac atggaattag gccagtgggt tcaactcaac tgctgttaaa tggcagtcta 600
gcagaagaag acatagtaat tagatctgaa gatttcacag acaatgttaa aaccataata 660
gtacagctaa atgaatctgt agtaattaat tgtacaagac ccaacaacaa tgctgcagaa 720
ttggataaat gggcaagtgc tgcaagacaa gcacattgta acattagtag agcaaaatgg 780
aataacactt tacaacagat agttataaaa ttaagagaaa aatttaggaa taaaacaata 840
gcctttaatc aatcctcagg aggggaccca gaaattgtaa tgcacagttt taattgtgga 900
ggggaatfff tctactgtaa tacagcacia ctgtttaata gtacttggaa tgttgcctga 960
gggacaaaatg gcactgaagg aaatgacata atcacactcc aatgcagaat aaaacaatt 1020
ataaatatgt ggcagaaagt aggaaaagca atgtatgccc ctcccatcac aggacaaatt 1080
agatgttcat caaatattac agggctgcta ctaacaagag atggaggtaa tagtactgag 1140
actgagactg agatcttcag acctggagga ggagataatg gggacaattg gagaagtgaa 1200
ttatataaat ataaaagtag aagaattgaa ccaataggag tagcaccac cagggcaaaag 1260
agaagaacag tgcaaaagaga aaaagagca gtgggaatag gagctgtgtt ccttgggttc 1320
ttgggagcag caggaagcac tatgggcgca gcgtcagtga cgctgacggt acaggccagg 1380
ctattattgt ctggtatagt gcagcagcag aacaatctgc tgagggtat tgaggcgcaa 1440
cagaatatgt tgcgactcac agtctggggc atcaagcagc tccaggcaag agtcctggct 1500
ctggaaagat acctaaagga tcaacagctc atgggaatff ggggttgcct tggaaaactc 1560
atttgcacca cttctgtgcc ttggaatggt agttggagta ataaatctgt ggatgatatt 1620
tggaataaca tgacctggat ggagtgggaa agagaaaatg acaattacac agactatata 1680
tatgacttac ttgaaaaatc gcaaacccaa caagaaaaga atgaaaaaga attattggaa 1740
ttggataaat gggcaagttt gtggaattgg tttgacataa caaactggct gtggtatata 1800
agataat
```

<210> 37

<211> 601

5

<212> PRT

<213> HIV-1

<400> 37

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

ES 2 632 723 T3

Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr
180 185 190
Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Asp Ile Val Ile Arg
195 200 205
Ser Glu Asp Phe Thr Asp Asn Val Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn
210 215 220
Glu Ser Val Val Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Ala Ala Glu
225 230 235 240
Leu Asp Lys Trp Ala Ser Ala Ala Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser
245 255
Arg Ala Lys Trp Asn Asn Thr Leu Gln Gln Ile Val Ile Lys Leu Arg
260 265 270
Glu Lys Phe Arg Asn Lys Thr Ile Ala Phe Asn Gln Ser Ser Gly Gly
275 280 285
Asp Pro Glu Ile Val Met His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe
290 295 300
Tyr Cys Asn Thr Ala Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Ala Gly
305 310 315 320
Gly Thr Asn Gly Thr Glu Gly Asn Asp Ile Ile Thr Leu Gln Cys Arg
325 330 335
Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Lys Val Gly Lys Ala Met Tyr
340 345 350
Ala Pro Pro Ile Thr Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly
355 360 365
Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Ser Thr Glu Thr Glu Thr Glu
370 375 380
Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu
385 390 395 400
Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Arg Ile Glu Pro Ile Gly Val Ala Pro
405 410 415
Thr Arg Ala Lys Arg Arg Thr Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly
420 425 430
Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met
435 440 445
Gly Ala Ala Ser Val Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Leu Leu Leu Ser
450 455 460
Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln
465 470 475 480
Gln Asn Met Leu Arg Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala
485 490 495
Arg Val Leu Ala Leu Glu Arg Tyr Leu Arg Asp Gln Gln Leu Met Gly
500 505 510
Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ser Val Pro Trp
515 520 525
Asn Val Ser Trp Ser Asn Lys Ser Val Asp Asp Ile Trp Asn Asn Met
530 535 540
Thr Trp Met Glu Trp Glu Arg Glu Ile Asp Asn Tyr Thr Asp Tyr Ile
545 550 555 560
Tyr Asp Leu Leu Glu Lys Ser Gln Thr Gln Gln Glu Lys Asn Glu Lys
565 570 575
Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asp
580 585 590
Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Arg
595 600

ES 2 632 723 T3

<210> 38

<211> 2370

<212> ADN

<213> HIV-1

5

<400> 38

```

atgagagtga aggagaata tcagcacttg tggagatggg ggtggagatg gggcaccatg 60
ctccttggga tgttgatgat ctgtagtgct acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat 120
ggggtagctg tgtggagaga agcaaccacc actctatfff gtgcatcaga tgctaaagcc 180
tatgatacag aggtacataa tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccac agaccccaac 240
ccacaagaag tagtattggg aaatgfgaca gaaaatfita acatgtggaa aaataacatg 300
gtagatcaga tgcattgagga tactfitaat tgtaaacact cagtattac acaggcctgt 360
aaattaacc cactctgtgt tctfitaat cactaacact aatttaggaa aatttaggaa 420
ccaaaggtat cctttcagcc aattcccata cattattgtg tcccggctgg gtttgcgata 480
ctaaagtgt acaataagac attcaatgga tcaggaccat gcacaaatgt cagcacagta 540
caatgtacac atggaattag gccagtggtg tcaactcaac tgctgttaaa tggcagctca 600
gcagaagaag acatagtaat tagatctgaa gatttcacag acaatgttaa aaccataata 660
gtacagctaa atgaatctgt agtaattaat tgtacaagac ccaacaacaa tgctgcagaa 720
ttggataaat gggcaagtgc tgcaagacaa gcacattgta acattagtag agcaaaatgg 780
aataacactt tacaacagat agttataaaa ttaagagaaa aatttaggaa taaaacaata 840
gcctfitaatc aatcctcagg aggggaccca gaaattgtaa tgcacagttt taattgtgga 900
ggggaatfff tctactgtaa tacagcacia ctgtfitaata gtacttggaa tgttgcctgga 960
gggacaaatg gcactgaagg aaatgacata atcacactcc aatgcagaat aaaacaaat 1020
ataaatatgt ggcagaaggt aggaaaagca atgtatgccc ctcccatcac aggacaaat 1080
agatgttcat caaatattac agggctgcta ctaacaagag atggaggtaa tagtactgag 1140
actgagactg agatcttcag acctggagga ggagataatg gggacaattg gagaagtgaa 1200
ttatataaat ataaagtagt aagaattgaa ccaataggag tagcaccac caggggcaaag 1260
agaagaacag tgcaaaagaga aaaaagagca gtgggaatag gagctgtgtt cctfgggttc 1320
ttgggagcag caggaagcac tatgggcgca gcgtcagtga cgctgacggt acaggccagg 1380
ctattattgt ctggtatagt gcagcagcag aacaatctgc tgagggtat tgaggcgcaa 1440
cagaatatgt tgcgactcac agtctggggc atcaagcagc tccaggcaag agtcctggct 1500
ctggaaagat acctaaagga tcaacagctc atgggaatff ggggttgcctc tggaaaactc 1560
atttgcacca cttctgtgcc ttggaatggt agttggagta ataaatctgt ggatgatatt 1620
tggaataaca tgacctggat ggagtgggaa agagaaatg acaattacac agactatata 1680
tatgacttac ttgaaaatc gcaaacccaa caagaaaaga atgaaaaga attattggaa 1740
ttggataaat gggcaagttt gtggaattgg tttagacataa caaactggct gtggtatata 1800
agattattca taatgatagt aggaggctt ataggttaa gaatagttt tgctgtactt 1860
tctatagtaa atagagttag gcagggatat tcaccattat cgtttcagac cctcctcca 1920
gcctcgagg gacccgacag gcccgagga acagaagaag aagtgaggaga gagagacaga 1980
gacagatccg gtccatcagt gaacggatcc ttggcactta tctgggacga tctgaggagc 2040
ctgtgcctct tcagctacca ccgcttgaga gacttactct tgattgtaac gaggattgtg 2100
gaacttctgg gacgcagggg gtgggaagcc ctcaaattt ggtggaatct cctacagtat 2160
tggagtcagg aactaaagaa tagtgctggt agcttgctac aatatgggtg gagctatttc 2220
catgaggcgg tccaggcgt ctggagatct gcgacagaga ctcttgcggg cgcgtgggga 2280
gacttatggg agactcttag gagaggtgga agatggatac tcgcaatccc caggaggatt 2340
agacaagggc ttgagctcac tctcttgtga 2370

```

10 <210> 39

<211> 789

<212> PRT

<213> HIV-1

15 <400> 39

Met Arg Val Lys Glu Lys Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp Gly Trp Arg

ES 2 632 723 T3

1			5			10			15						
Trp	Gly	Thr	Met 20	Leu	Leu	Gly	Met	Leu 25	Met	Ile	Cys	Ser	Ala 30	Thr	Glu
Lys	Leu	Trp 35	Val	Thr	Val	Tyr	Tyr 40	Gly	Val	Pro	Val	Trp 45	Arg	Glu	Ala
Thr	Thr 50	Thr	Leu	Phe	Cys	Ala 55	Ser	Asp	Ala	Lys	Ala 60	Tyr	Asp	Thr	Glu
Val 65	His	Asn	Val	Trp	Ala 70	Thr	His	Ala	Cys	Val 75	Pro	Thr	Asp	Pro	Asn 80
Pro	Gln	Glu	Val	Val 85	Leu	Gly	Asn	Val	Thr 90	Glu	Asn	Phe	Asn	Met 95	Trp
Lys	Asn	Asn	Met 100	Val	Asp	Gln	Met	His 105	Glu	Asp	Ile	Ile	Ser 110	Leu	Trp
Asp	Glu	Ser 115	Leu	Lys	Pro	Cys	Val 120	Lys	Leu	Thr	Pro	Leu 125	Cys	Val	Thr
Leu	Asn 130	Cys	Asn	Thr	Ser	Val 135	Ile	Thr	Gln	Ala	Cys 140	Pro	Lys	Val	Ser
Phe 145	Gln	Pro	Ile	Pro	Ile 150	His	Tyr	Cys	Val	Pro 155	Ala	Gly	Phe	Ala	Ile 160
Leu	Lys	Cys	Asn	Asn 165	Lys	Thr	Phe	Asn	Gly 170	Ser	Gly	Pro	Cys	Thr 175	Asn
Val	Ser	Thr	Val 180	Gln	Cys	Thr	His	Gly 185	Ile	Arg	Pro	Val	Val 190	Ser	Thr
Gln	Leu	Leu 195	Leu	Asn	Gly	Ser	Leu 200	Ala	Glu	Glu	Asp	Ile 205	Val	Ile	Arg
Ser	Glu 210	Asp	Phe	Thr	Asp	Asn 215	Val	Lys	Thr	Ile	Ile 220	Val	Gln	Leu	Asn
Glu 225	Ser	Val	Val	Ile	Asn 230	Cys	Thr	Arg	Pro	Asn 235	Asn	Asn	Ala	Ala	Glu 240
Leu	Asp	Lys	Trp	Ala 245	Ser	Ala	Ala	Arg	Gln 250	Ala	His	Cys	Asn	Ile 255	Ser
Arg	Ala	Lys	Trp 260	Asn	Asn	Thr	Leu	Gln 265	Gln	Ile	Val	Ile	Lys 270	Leu	Arg
Glu	Lys	Phe 275	Arg	Asn	Lys	Thr	Ile 280	Ala	Phe	Asn	Gln	Ser 285	Ser	Gly	Gly
Asp	Pro 290	Glu	Ile	Val	Met	His 295	Ser	Phe	Asn	Cys	Gly 300	Gly	Glu	Phe	Phe
Tyr 305	Cys	Asn	Thr	Ala	Gln 310	Leu	Phe	Asn	Ser	Thr 315	Trp	Asn	Val	Ala	Gly 320
Gly	Thr	Asn	Gly	Thr 325	Glu	Gly	Asn	Asp	Ile 330	Ile	Thr	Leu	Gln	Cys 335	Arg
Ile	Lys	Gln	Ile 340	Ile	Asn	Met	Trp	Gln 345	Lys	Val	Gly	Lys	Ala 350	Met	Tyr
Ala	Pro	Pro 355	Ile	Thr	Gly	Gln	Ile 360	Arg	Cys	Ser	Ser	Asn 365	Ile	Thr	Gly
Leu	Leu	Leu	Thr	Arg	Asp	Gly	Gly	Asn	Ser	Thr	Glu	Thr	Glu	Thr	Glu

ES 2 632 723 T3

<210> 40
 <211> 1092
 <212> ADN
 <213> HIV-1

5

<400> 40

```

atgggcgccc gcgccagcgt gctgagcggc ggcgagctgg accgctggga gaagatccgc 60
ctgcgccccg gcggaagaa gaagtacaag ctgaagcaca tcgtgtgggc cagccgcgag 120
ctggagcgtc tcgccgtgaa ccccgccctg ctggagacca gcgagggtg ccgccagatc 180
ctgggcccagc tgcagcccag cctgcagacc ggcagcgagg agctgcgcag cctgtacaac 240
accgtggcca ccctgtactg cgtgcaccag cgcacgcagg tgaaggacac caaggaggcc 300
ctggagaaga tcgaggagga gcagaacaag agcaagaaga aggccagca ggccgcccgc 360
gacaccggca acagcagcca agtgagccag aactacccca tcgtgcagaa cctgcagggc 420
cagatggtgc accaggccat cagccccgc accctgaacg cctgggtgaa ggtggtggag 480
gagaaggcct tcagccccga ggtgatcccc atgttcagcg ccctgagcga gggcgcccacc 540
ccccaggacc tgaacacccat gctgaacacc gtgggcggcc accaggccgc catgcagatg 600
ctgaaggaga ccatcaacga ggaggccgcc gagtgggacc gcctgcacc cgtagcagcc 660
ggccccatcg cccccggcca gatgcgcgag ccccgcgcca gcgacatcg cggcaccacg 720
agcaccctgc aggagcagat cggctggatg accaacaacc cccctatccc cgtgggagag 780
atctacaagc gctggatcat cctgggcctg aacaagatcg tgcgcatgta cagccccacg 840
agcatcctgg acatccgcca gggccccaa gagcccttc gcgactacgt ggaccgcttc 900
tacaagacc tgcgggccga gcaggccagc caggaggtga agaactggat gaccgagacc 960
ctgctggtgc agaacgcaa ccccgactgc aagaccatcc tgaaggccct gggccccgc 1020
gccaccctgg aggagatgat gaccgctgc cagggcgtgg gcggccccgg ccacaaggcc 1080
cgcgtgctgt aa
    
```

10 <210> 41
 <211> 363
 <212> PRT
 <213> HIV-1

15 <400> 41

```

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp
  1           5           10           15
Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys
          20           25           30
His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro
          35           40           45
Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu
  50           55           60
Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
  65           70           75           80
Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Val Lys Asp
          85           90           95
Thr Lys Glu Ala Leu Glu Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
          100          105          110
Lys Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly Asn Ser Ser Gln Val
          115          120          125
    
```

ES 2 632 723 T3

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

<210> 42

<211> 309

5 <212> ADN

<213> HIV-1

<400> 42

atggagccag tagatcctag actagagccc tggaagcatc cagggagtaa gcctaaaact 60
 gcttgtagca attgctattg taaaaagtgt tgctttcatt gccaaagttag tttcacaaca 120
 aaagccttag gcatctccta tggcaggaag aagcggagac agcgacgaag agctcatcag 180
 aacagtcaga ctcatcaagc ttctctatca aagcagccct cctcccagcc tcgaggggac 240
 ccgacaggcc cgaaggaaca gaagaagaag gtggagagag agacagagac agatccggtc 300
 catcagtga 309

10

<210> 43

<211> 102

<212> PRT

15 <213> HIV-1

ES 2 632 723 T3

<400> 43

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Lys Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30
 His Cys Gln Val Cys Phe Thr Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Ala His Gln Asn Ser Gln Thr
 50 55 60
 His Gln Ala Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ser Ser Gln Pro Arg Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Thr Gly Pro Lys Glu Gln Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
 85 90 95
 Thr Asp Pro Val His Gln
 100

REIVINDICACIONES

1. Virus recombinante del sarampión que expresa una secuencia heteróloga de aminoácidos de un antígeno de un flavivirus determinado, siendo dicho virus recombinante del sarampión el producto de la expresión de una secuencia de nucleótidos recombinante que comprende una molécula de ADNc que codifica el ARN (+) antígenómico de longitud completa del virus del sarampión que se origina de la cepa Schwarz, en el que dicha molécula de ADNc comprende el inserto contenido en el plásmido pTM-MV Schw depositado con el N° I-2889 en el CNCM el 12 de junio de 2002, en el que dicho inserto codifica la secuencia de nucleótidos de la hebra de ARN antígenómico (+) de longitud completa del virus del sarampión y se recombina con una secuencia heteróloga de nucleótidos que codifica dicha secuencia heteróloga de aminoácidos de dicho antígeno de dicho flavivirus determinado en un sitio de inserción de dicho ADNc en la región en la dirección 5' del gen L de dicho ADNc bajo el control de la secuencia de control de la expresión, y dicho virus recombinante del sarampión provoca una respuesta inmune humoral y/o celular protectora contra dicho flavivirus determinado o contra tanto el virus del sarampión como contra dicho flavivirus determinado.
2. Virus recombinante del sarampión de acuerdo con la reivindicación 1, que es rescatado de células auxiliares transfectadas con una secuencia de nucleótidos recombinante que comprende ADNc que codifica la secuencia de nucleótidos del ARN antígenómico (+) de longitud completa del virus del sarampión, estando dicho ADNc recombinado con una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia heteróloga de aminoácidos flaviviral, y cumpliendo dicha secuencia de nucleótidos recombinante la regla de seis.
3. Virus recombinante del sarampión de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la secuencia de nucleótidos recombinante es del inserto contenido en el plásmido pTM-MV Schw2-gfp depositado el 12 de junio de 2002 con I-2890 (CNCM), en el que la secuencia del gen gfp está sustituida por una secuencia que codifica dicha secuencia heteróloga de aminoácidos determinada de dicho antígeno de dicho flavivirus.
4. Virus recombinante del sarampión de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la molécula de ADNc se selecciona entre las siguientes secuencias:
- secuencia de nucleótidos que se extiende desde el nucleótido 83 hasta el nucleótido 15977 de SEQ ID NO:16;
 - secuencia de nucleótidos que se extiende desde el nucleótido 29 hasta el nucleótido 15977 de SEQ ID NO:16;
 - secuencia de nucleótidos que se extiende desde el nucleótido 29 hasta el nucleótido 16202 de SEQ ID NO:16;
 - secuencia de nucleótidos que se extiende desde el nucleótido 26 hasta el nucleótido 15977 de SEQ ID NO:16;
 - secuencia de nucleótidos que se extiende desde el nucleótido 26 hasta el nucleótido 16202 de SEQ ID NO:16;
 - secuencia de nucleótidos que se extiende desde el nucleótido 9 hasta el nucleótido 15977 de of SEQ ID NO:16;
- y
- secuencia de nucleótidos que se extiende desde el nucleótido 9 hasta el nucleótido 16202 de SEQ ID NO:16.
5. Vector de virus recombinante del sarampión que comprende un replicón que comprende (i) una molécula de ADNc que codifica el ARN antígenómico (+) de longitud completa de un virus del sarampión operativamente unido a (ii) secuencias de control de la expresión y (iii) una secuencia heteróloga de ADN que codifica una secuencia heteróloga de aminoácidos, estando dicha secuencia heteróloga de ADN clonada en dicho replicón en condiciones que permiten su expresión y teniendo dicho replicón un número total de nucleótidos que cumple la regla del seis, en el que dicha molécula de ADNc comprende una molécula de ADNc que codifica el ARN antígenómico (+) de longitud completa del virus del sarampión que se origina de la cepa Schwarz recombinada con una molécula de ADNc que codifica una secuencia heteróloga de aminoácidos, y en el que dicho vector de virus recombinante del sarampión es preferentemente un plásmido y el ADNc que codifica el ARN antígenómico (+) de longitud completa del virus del sarampión y la secuencia de control de la expresión son de pTM-MV Schw depositado en el CNCM con el N° I-2889.
6. Vector de virus recombinante del sarampión de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la secuencia heteróloga de ADN se clona dentro de una Unidad de Transcripción Adicional (ATU) insertada en el ADNc correspondiente al ARN antígenómico de virus del sarampión, y en el que el sitio de clonación de la ATU se elige preferentemente:
- en la dirección 5' del gen N del virus del sarampión, o
 - entre los genes P y M del virus del sarampión, o
 - entre los genes H y L del virus del sarampión.
7. Vector de virus recombinante del sarampión de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que la secuencia heteróloga de ADN está bajo el control de la secuencia de control de la expresión elegida de forma que dicha secuencia heteróloga se exprese o no se exprese como una proteína de fusión con una de las proteínas del virus del sarampión.

8. Vector de virus recombinante del sarampión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que expresa epítopes que provocan anticuerpos neutralizantes contra dicha secuencia heteróloga de aminoácidos que es de un antígeno de un flavivirus determinado.
- 5 9. Vector de virus recombinante del sarampión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que el replicón se diseña de acuerdo con el mapa de la Figura 2 en el que « inserto » representa la secuencia heteróloga de ADN.
- 10 10. Un sistema de recuperación para el ensamblaje de virus recombinante del sarampión que expresa una secuencia heteróloga de aminoácidos, que comprende una célula determinada transfectada con un vector de virus recombinante del sarampión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, y una célula auxiliar determinada recombinada con al menos un vector adecuado para la expresión de la ARN polimerasa T7 y expresión de las proteínas N, P y L del virus del sarampión.
11. Una composición inmunogénica o una composición de vacuna que comprende un virus recombinante del sarampión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un vector recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.
- 15 12. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 11, que induce protección contra partículas tipo virus heterólogas o contra proteínas de premembrana y de la envoltura.
13. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, que provoca:
- una respuesta inmune humoral y/o celular en un modelo animal susceptible al virus del sarampión; y/o
 - anticuerpos neutralizantes contra la secuencia heteróloga de aminoácidos en un modelo de animal mamífero susceptible al virus del sarampión; y/o
 - anticuerpos neutralizantes contra la secuencia heteróloga de aminoácidos en un mamífero.
- 20

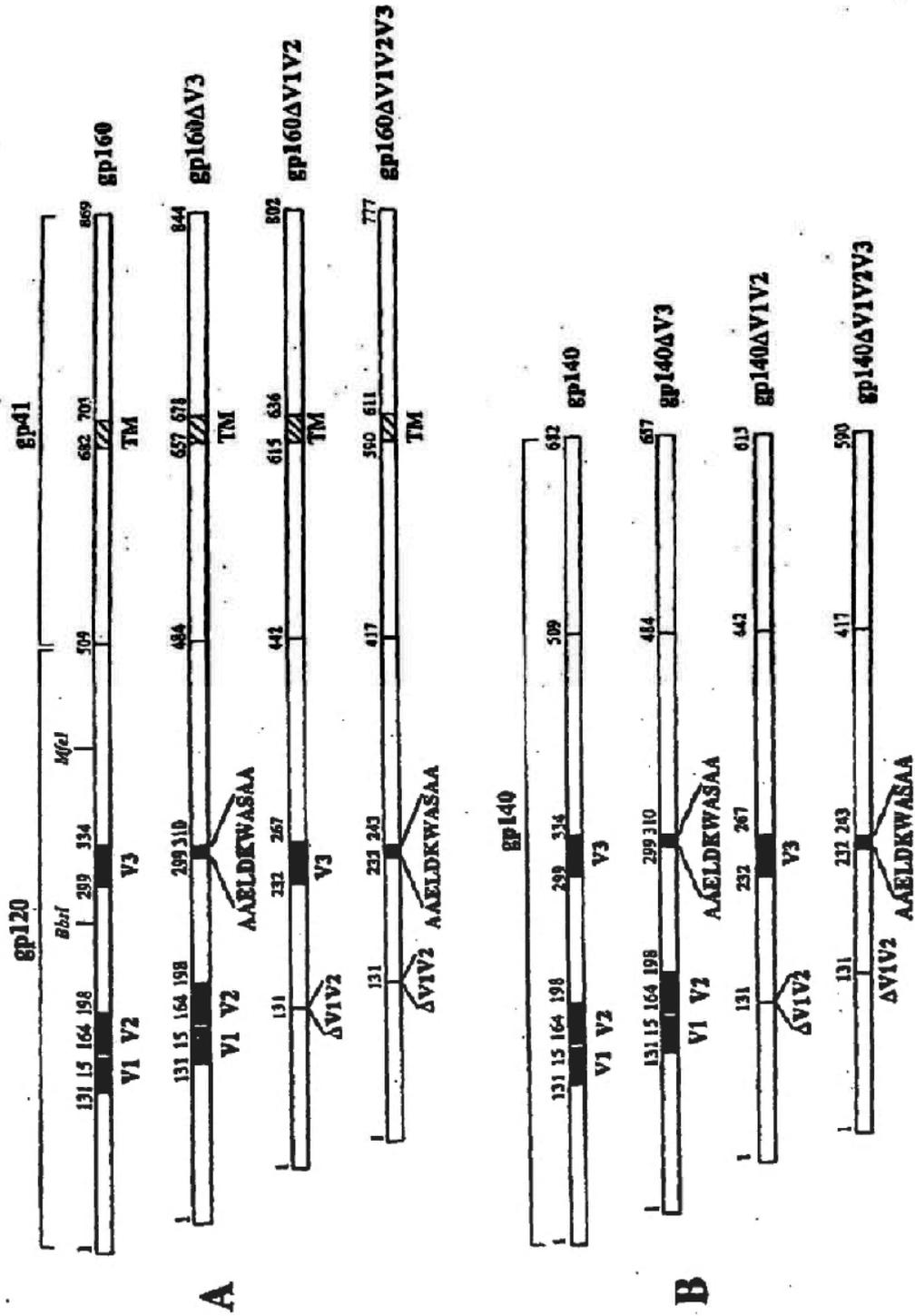


Figura 1

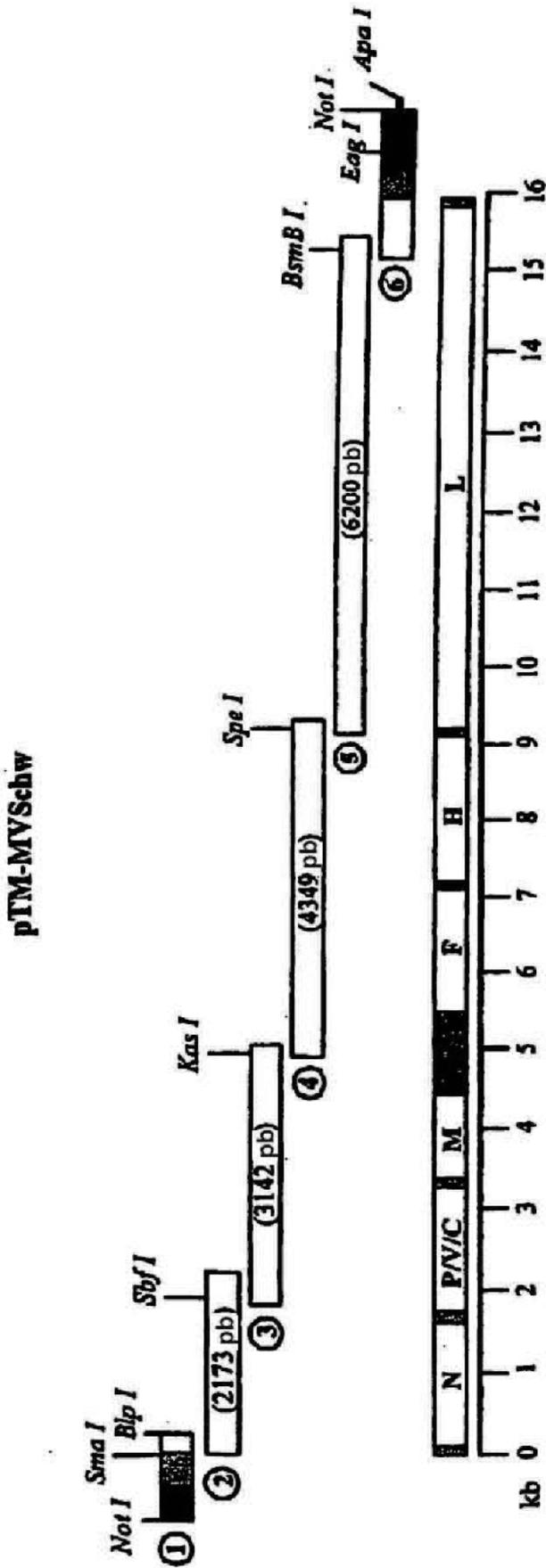


FIGURA 2A

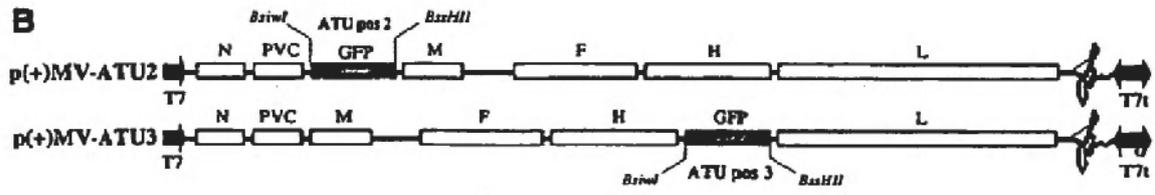


Figura 2B

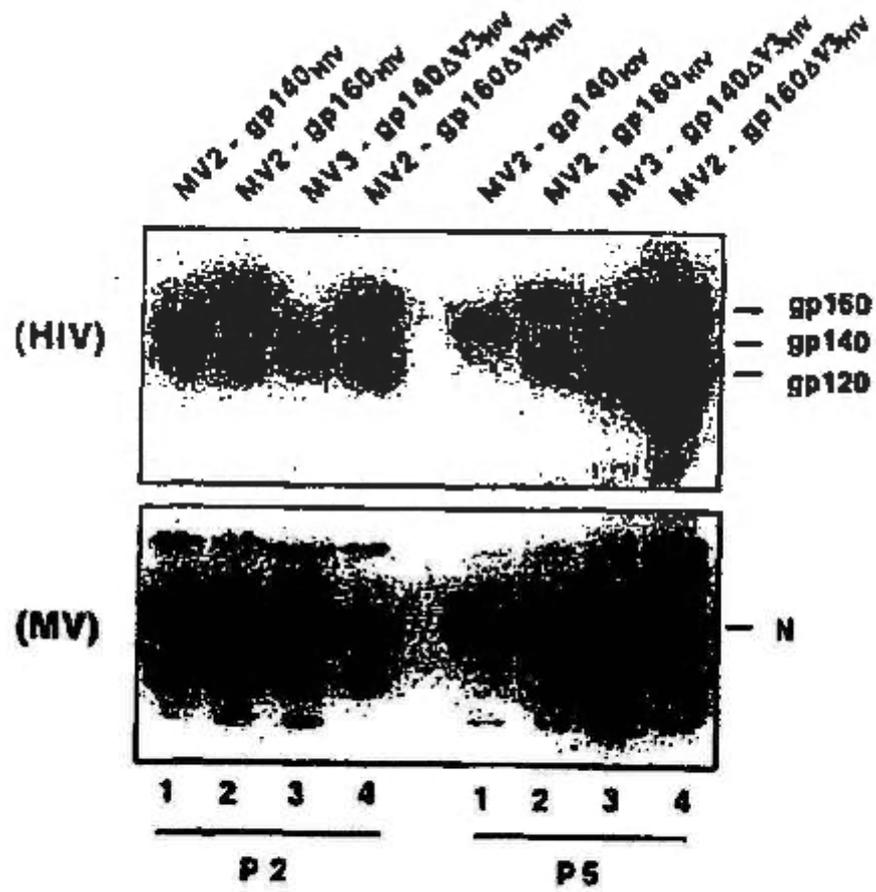
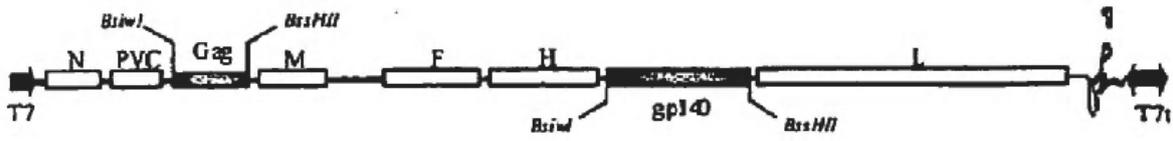


Figura 3A



pTM-MV Schw2-Gag-3-gp 140

Figura 3B B (1)

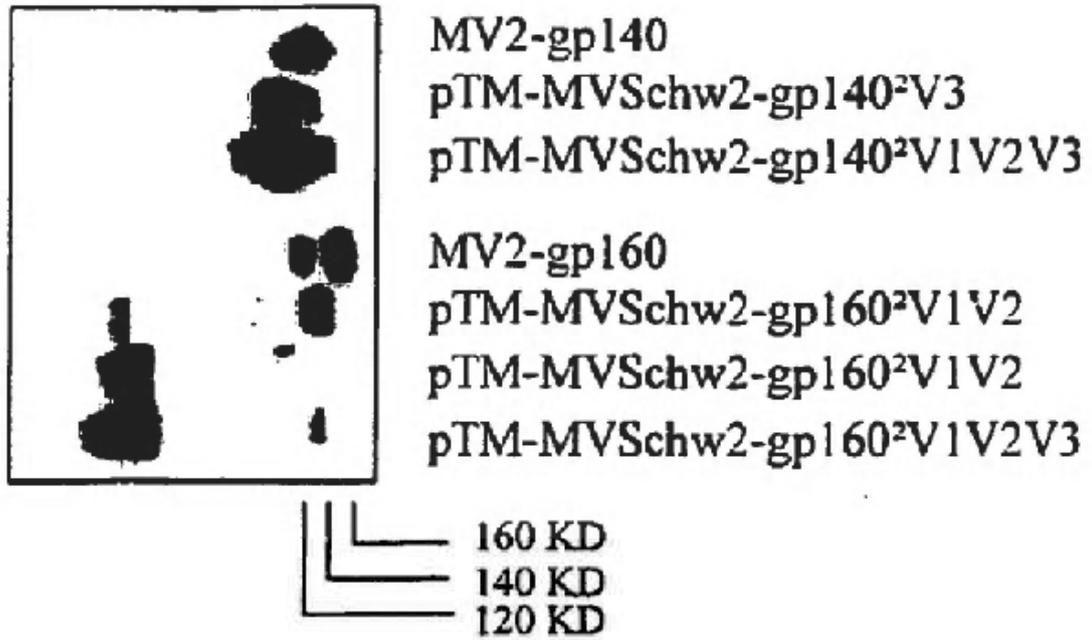


Figura 3(B)A

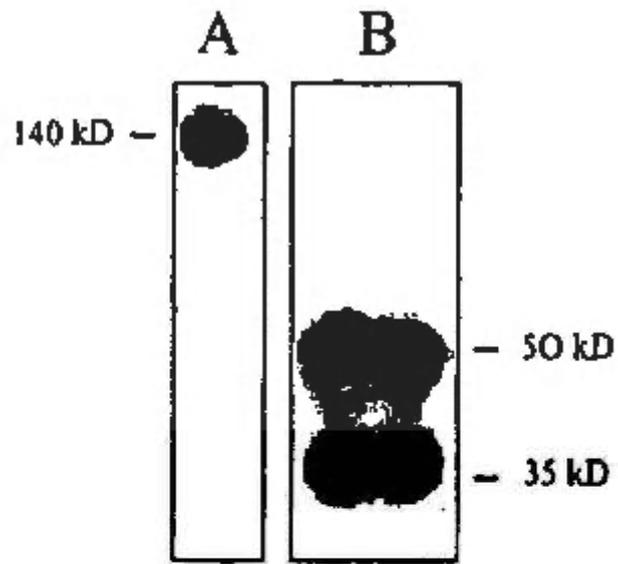


Figura 3B B (2)

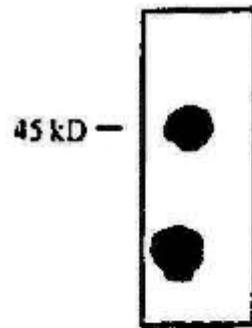


Figura 3C

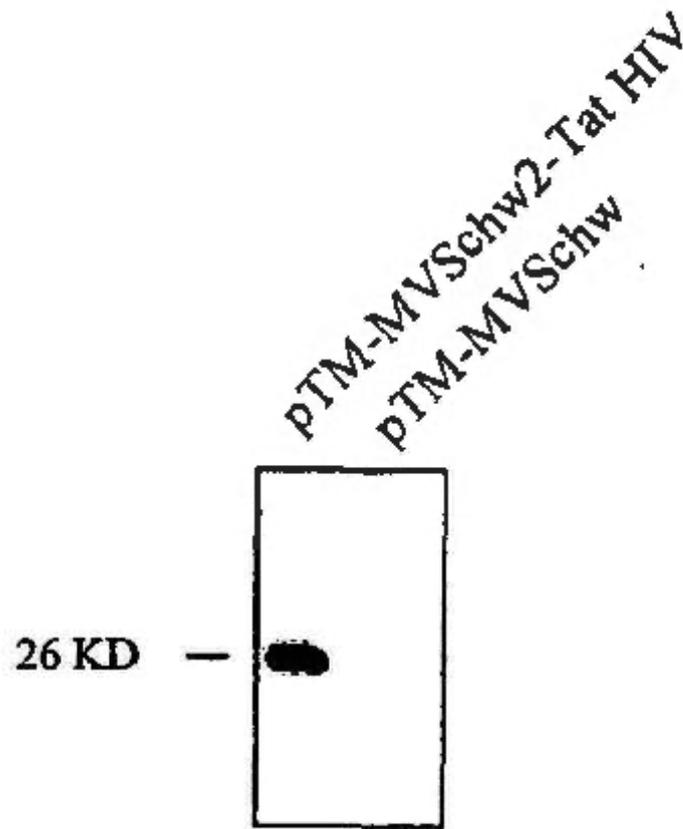


Figura 3D

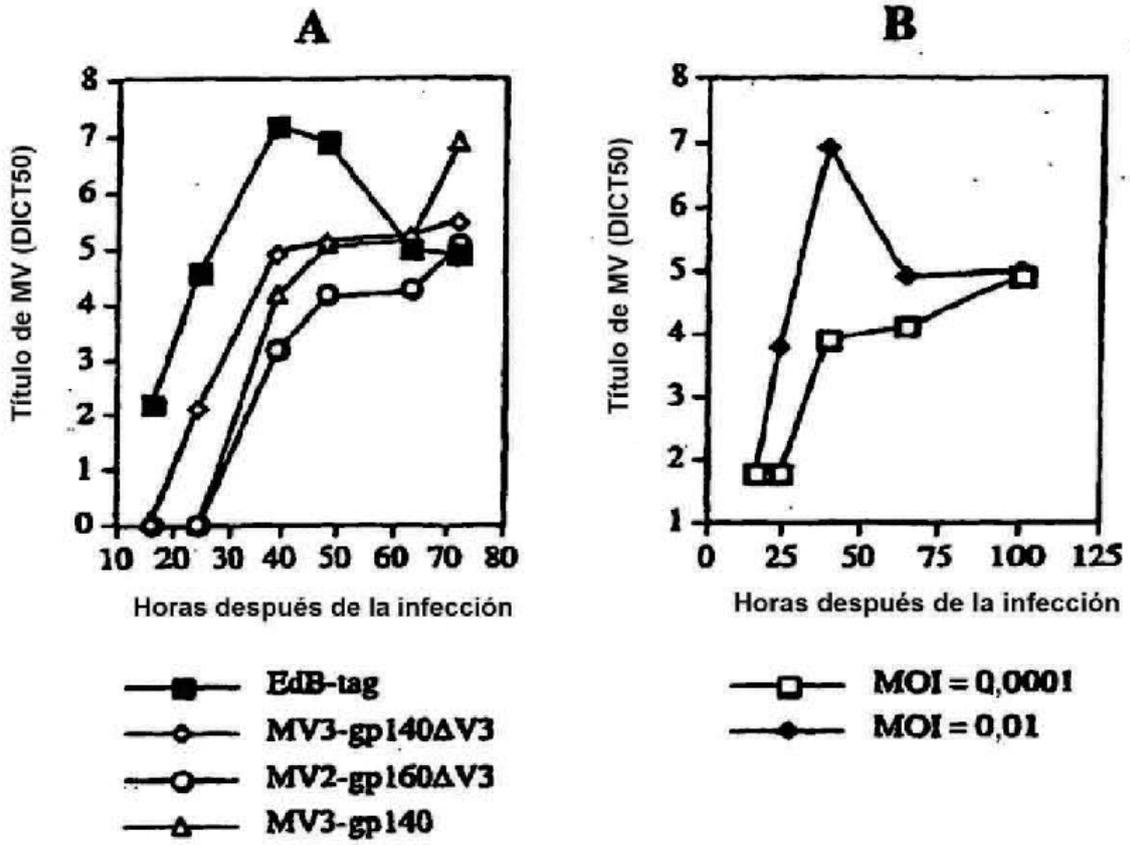


Figura 4

Figura 5

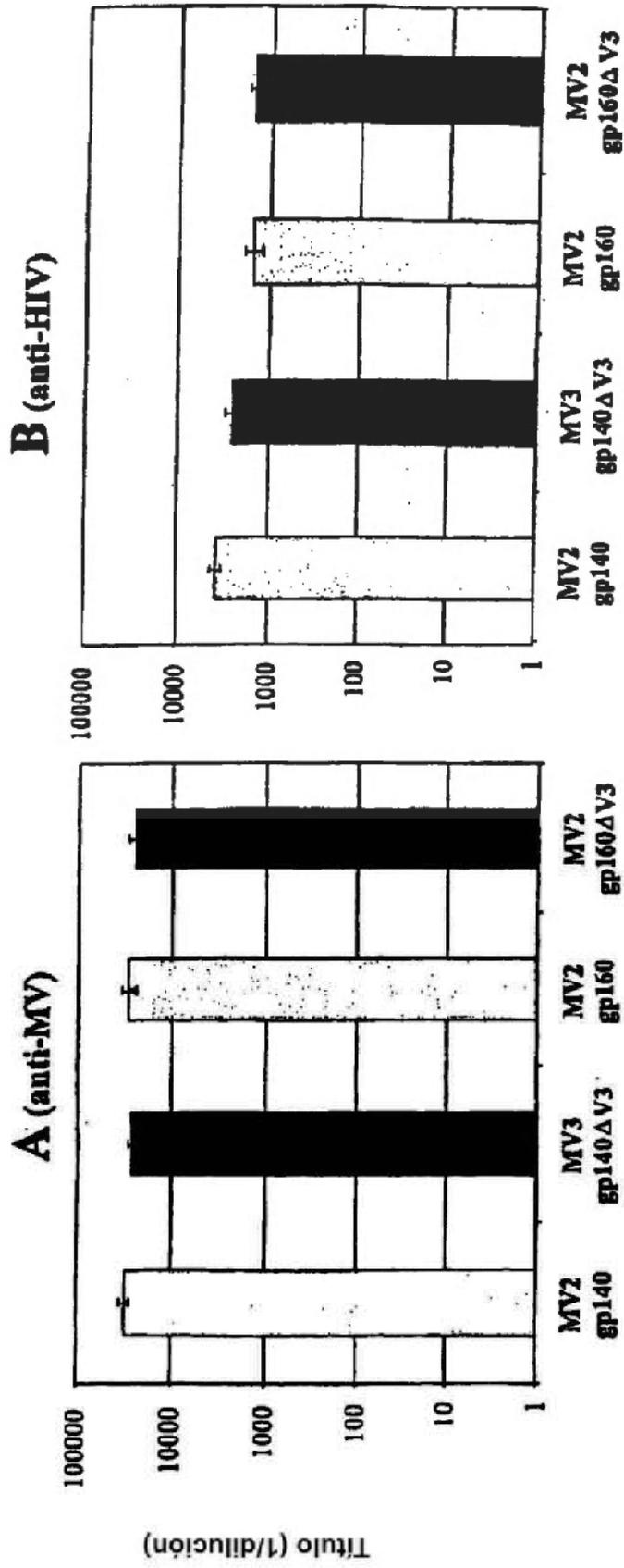


Figura 5C

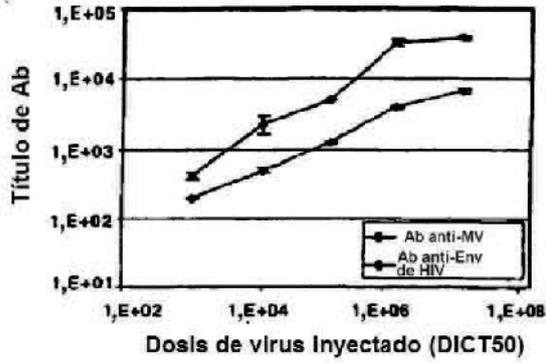


Figura 5D

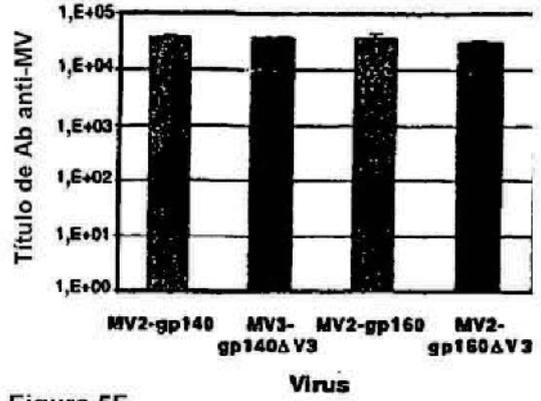


Figura 5E

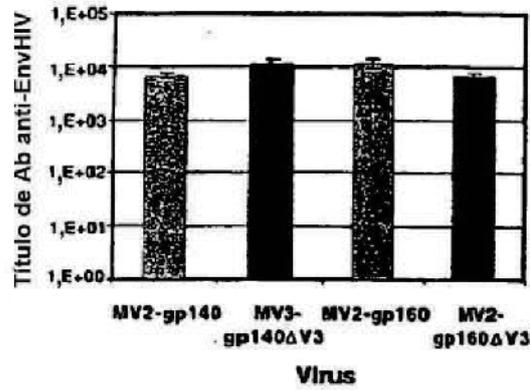


Figura 5F

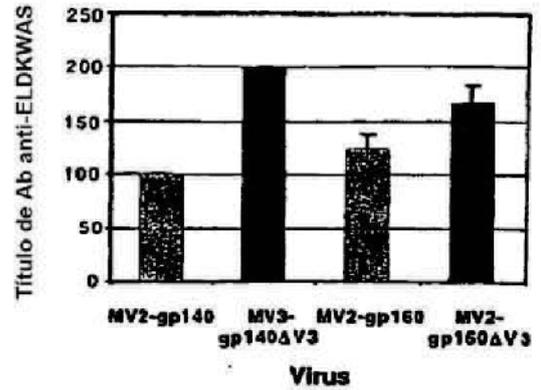
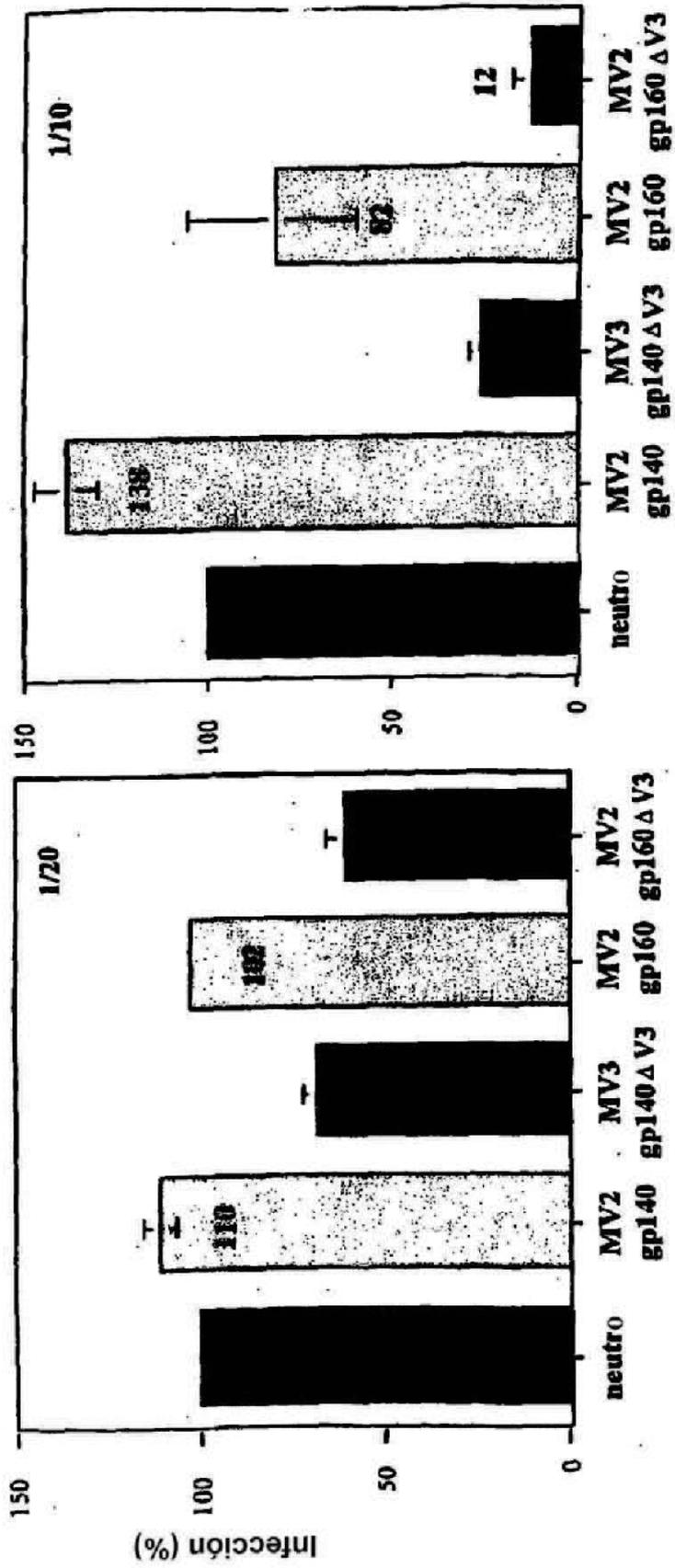


Figura 6



A-La estimulación de esplenocitos inmunes genera ELISpots de γ -IFN

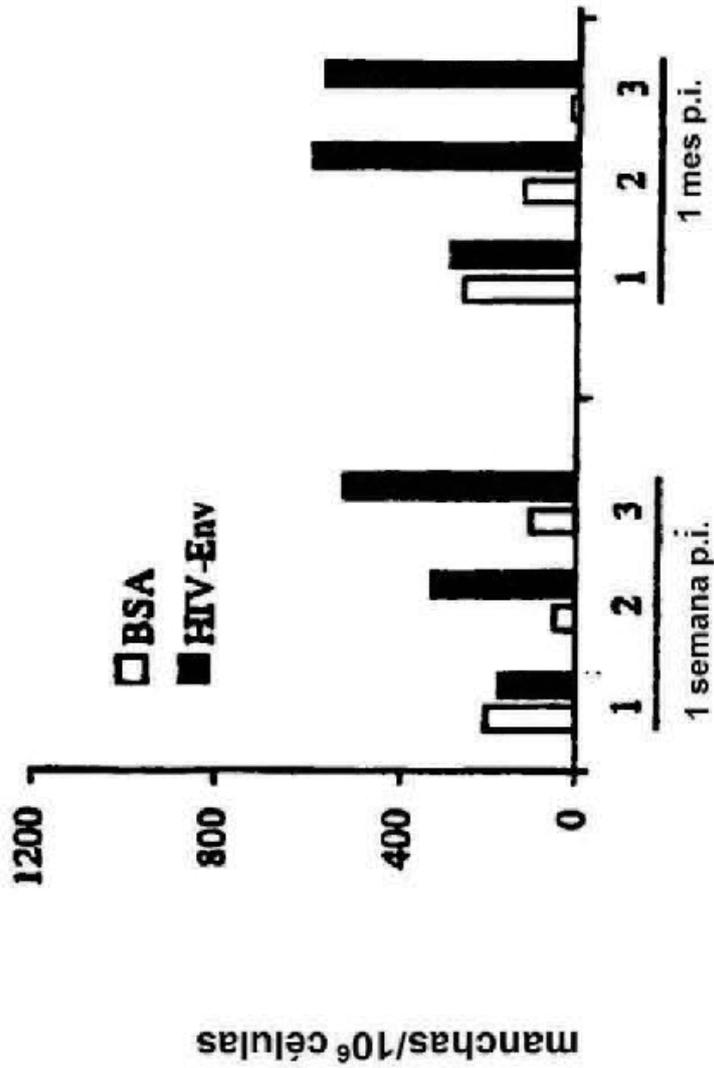


Figura 7A

B-La vacunación con Edm-gp160 genera linfocitos tanto CD4+ como CD8+ específicos de Env

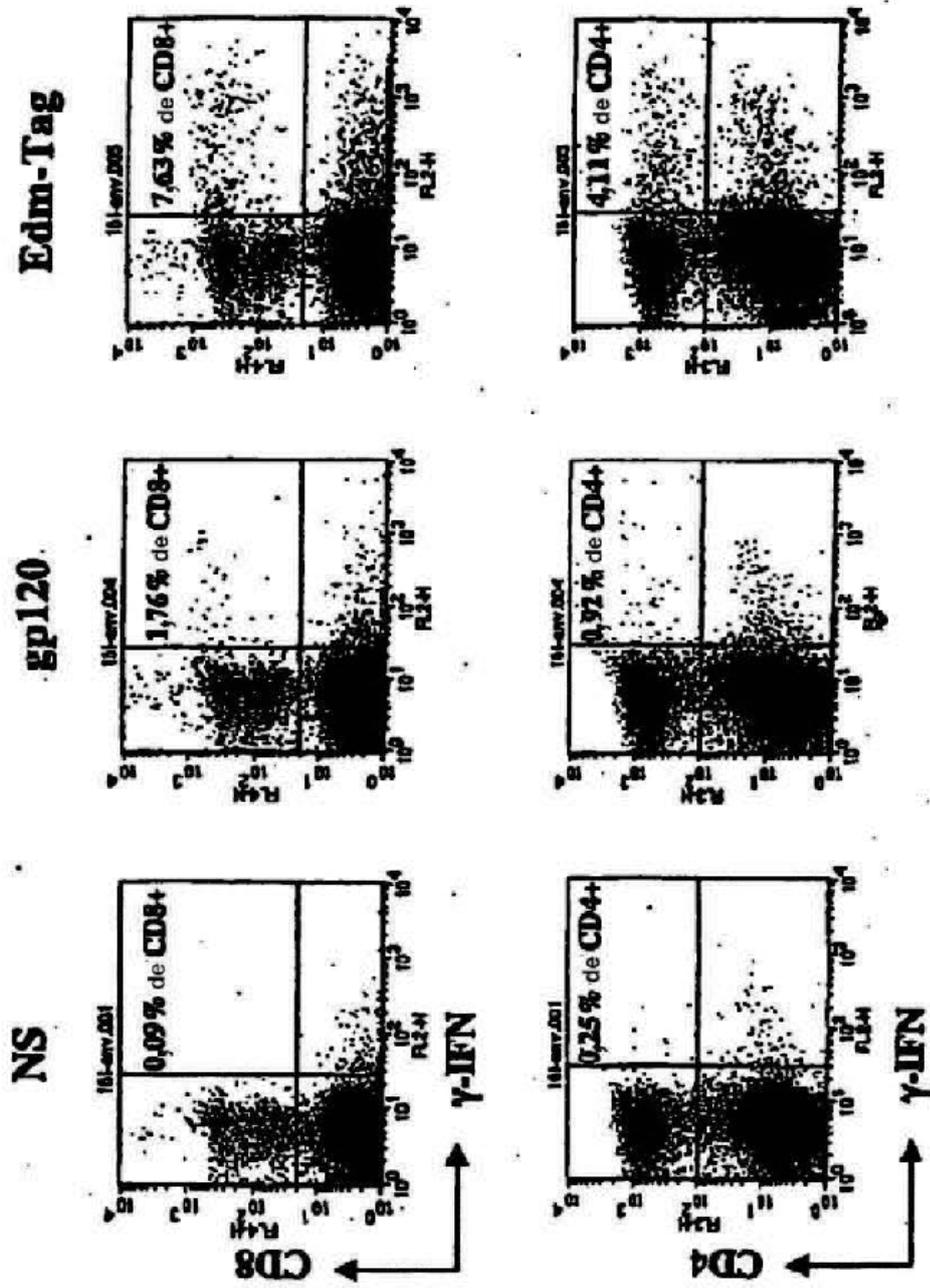


Figura 7B

Figura 7C

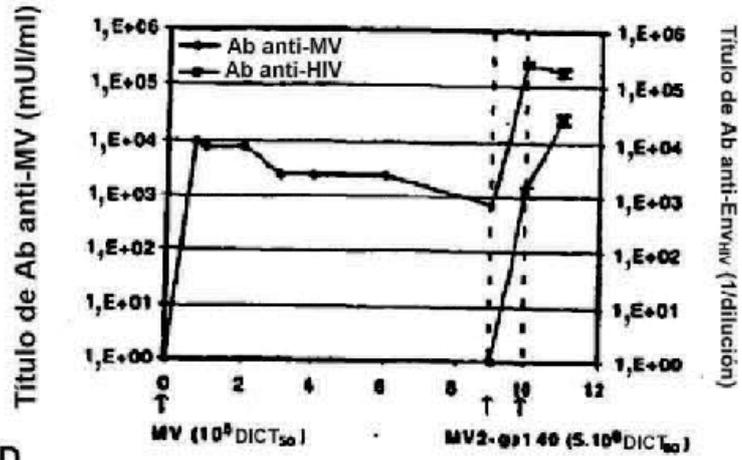
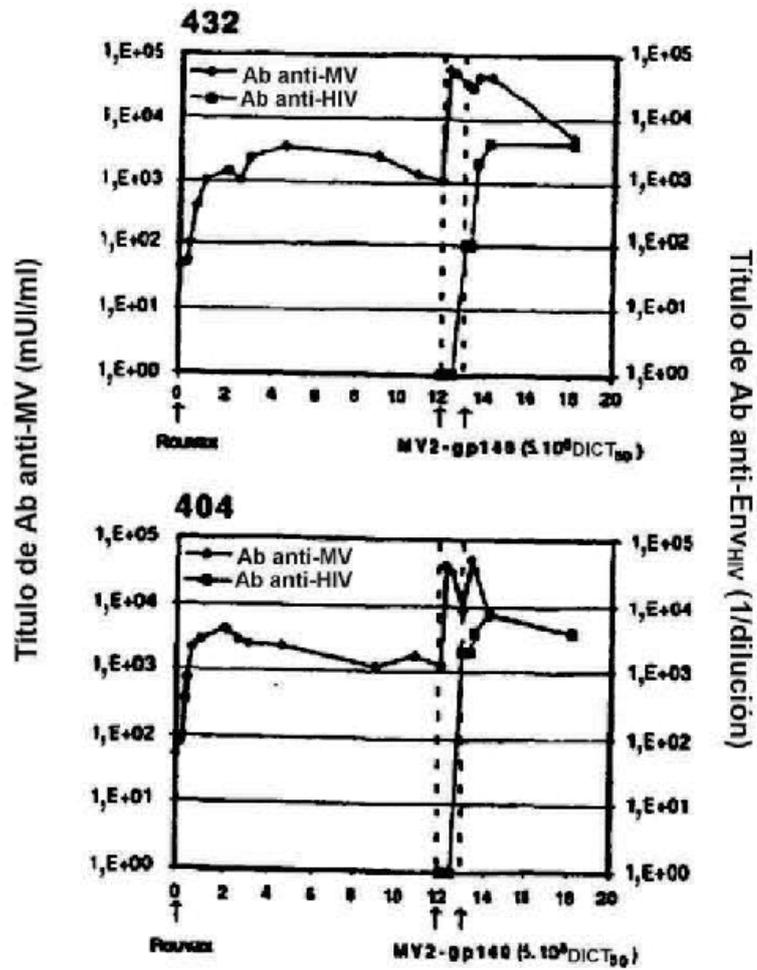
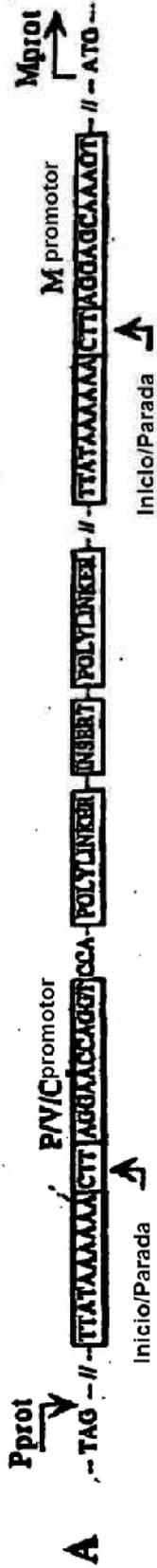


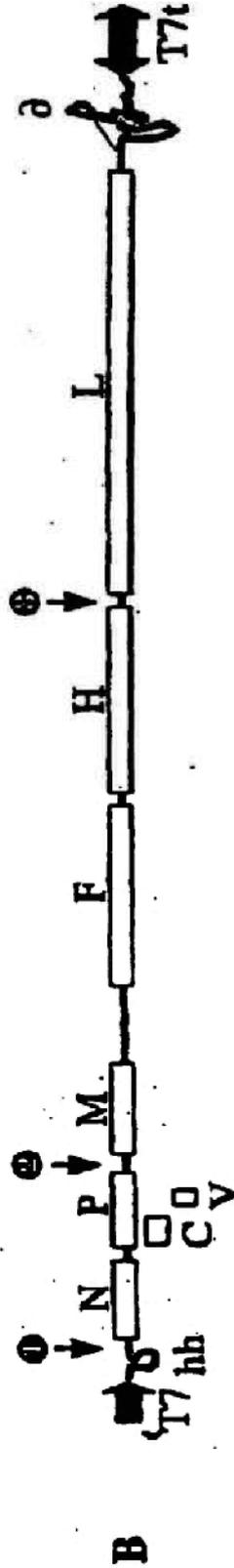
Figura 7D



Meses después de la sensibilización



Unidad de Transcripción Adicional Posición 2



T7 = promotor de la ARN polimerasa T7; T7t = terminador de la ARN polimerasa T7; hh = ribozima en cabeza de martillo
 ∅ = ribozima genómica del virus de la hepatitis delta (HDV); plásmido=pTM

⊕ ⊕ ⊕ = unidades de transcripción adicionales (ATU)

FIGURA 8

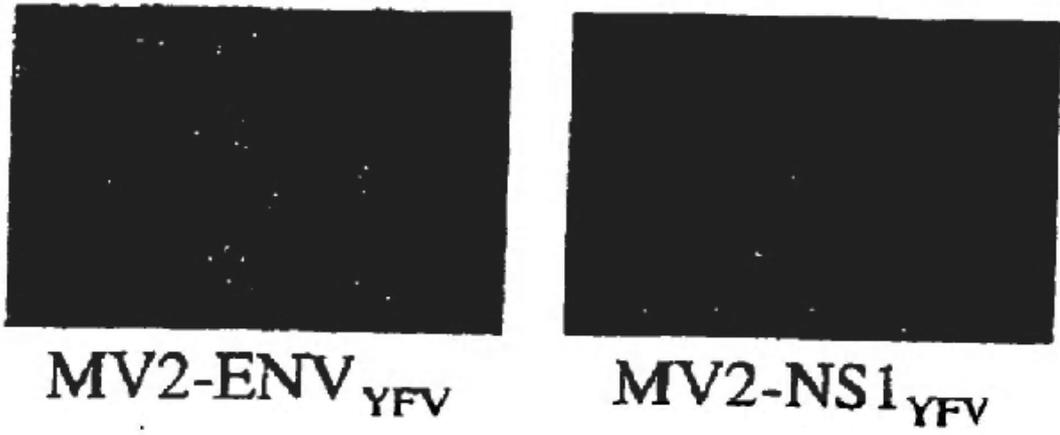


Figura 9

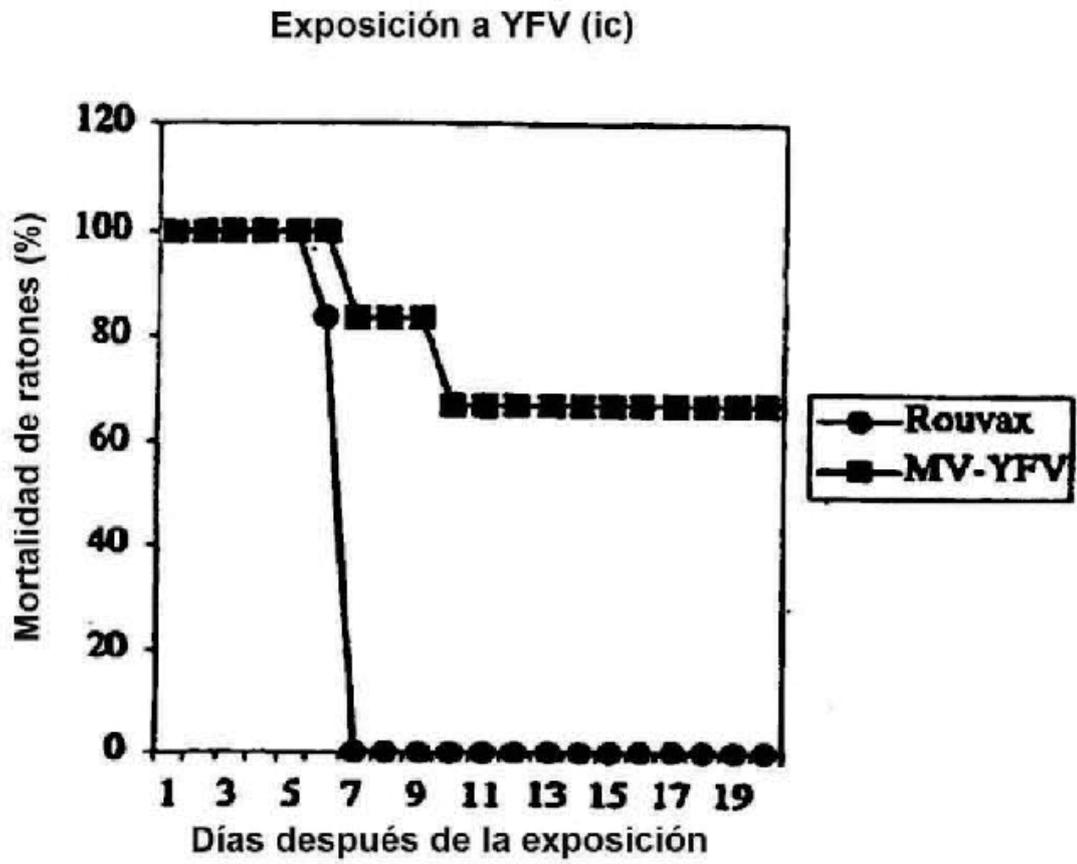


Figura 10

4001 GCATCACCCG TCTTTCCGGT AACGGGTATT ACACCGTTCC TAGRANATG
4101 TAGGATTGAC AAGCGGATAG GCCCTGGGAA GATCATCGAC MAIRKAGAGC
4201 AAGRGTTGAG TCTACTCTGC CGATFATTGC AARATGAAA TCGARAAGAT
4301 GRAGCACAGG CAAATACAGC AAGACTTCC ATGCRAACT CGGTTCCRAG
4401 ACTCTCGAGG AGCAGATGCA AGATAGTAG ATYCCAGGCA GTTTGGAGC
4501 SACCAAGGAC TATTCANAGT TCTGTAGACC GTAGTGCCA GCNATGCCC
4601 CCTCCGAAAG ACTCCACGGA CCAAGCGAGA GGCCAGCCMG CAGCCGAGCC
4701 CACCAACAGC CACCCCRATC TGCATCTCC TCGRGGGACC CCGAGGCC
4801 CCGGGGAAAG AAGCCCCAG CNATFGNAG GCGCTCCCC CTTCTCCCA
4901 CGAGGCATCC GACTCCCTAG ACAGNTCCTE TCTCCCGGC AACTNARCA
5001 CACGGGCGCG CGDCCCCMAC CCCCACRAC CAGAGGGAC CCCCACCAA
5101 GACCCAGCAC CCAACCATCG ACNATCCNAG AGGGGGGGC CCCCCAARA
5201 CACACACGAC CACGGCNAAC AABCAGNAC CCAGACCAC CTGGBCAAC
5301 GCACCCGAGC CCGATCCGG CGGGAGCCA CCCCACCGA ACCNGCAC
5401 CAGCCTTCC AAGTCCCGG GTCTCCCTCT CTTCTCGAG GGACNARAG
5501 ACCGGGATC CCAGANTCAA GACTCATCEA ATGTCCATCA TGGTCTCMA
5601 CCACGGTCA AATCCNTGG GGCNATCTCT CTAAGTATAG GGTGTAGGA
5701 AGTCATARA TTAATGCCA ATATNACTCT CCTCNATAC TGCNAGAGG
5801 AGAGATGCAC TTAATGCAAT GACCCAGRAT ATAGRCCCG TTCNAGTGT
5901 CGGCCCTIAG CGTGTCCACA GCTGCTCAGA TAACAGCCGG CATFRACT
6001 GBRNACTACT AATCAGGCAA TTGAGACRAT CAGACNAGC GGCNAGGA
6101 CCGCTPATGA ACCNACTATC TTGTGATTA ATCCGCCAGH AGCTGGGCT
6201 TAGGGGACC CATPATCTGG GAGATATCTA TCCAGGCTTI GACTTGGC
6301 TIGATTTACTG GSPATCTTAG AGAGGGGAG ANTAAGGCC CCGATNACTC
6401 CTGTCCGAGA TTAAGGGGGT GNTTCTCCAC CGGTAGAGG GGGTCTGTA
6501 CCCAAGGTA CTTATCTCG ANTTTGNIG AGTCATCGTG TACTTTCATG
6601 GCTCCAGRA TGCTCCGGG GGTACACCAA GTCTGTGCT CBTACACTCG
6701 GCCAATGTG CATCNATCCT TTGCAAGTGT TACACANACG GAACGATCAT
6801 CCGTAGTCA GBTBRACGEC GTGACCATCC AAGTCGGAG CAGAGGTVAI
6901 GGAGAGCTTG GACGTAGGGA CAATCTGGG GNTCGNAT GCTAAGTIG
7001 AAGGTTTAT CGAGACTAG CATAGCTAC ATCTGRTTG CAGTGTGCT
7101 GTANCAARA GGRGACRCA GTTGTATGT CMAACCCAG CETAANGCT
7201 AACTCTGAA ACACAAATGT CCCACRAGTC TCCCTTCCG CATCNAGCA
7301 GGCCGACAA TATGGGTAT TATCAARAC TTAGGTGCA ABATCTCA
7401 CATCCAAAG GAGTAGGAT AGTCATNAC AGRANEARC TATANTGA
7501 TCGGGTIGCT AGCCATGCA GGCATAGAC TTAATCGGC AGCCATNAC
7601 AATCGAGCAT CAGTCAAGG ACCGTCTGAC ACCACTTTC AANATCTG
7701 TTNATCTCTG ACAAGATTRA ATTCCTNAT CCGGATGEG KUTACGACTT
7801 ATGATCARATA CTGTGCAGAT GTGGCTGCTG ANGACTCAI GAATCTG
7901 CTCMAAGGA AACTGCTCAG GGCCACTAC ANYAGAGGT CAATCTCA
8001 TCATCTATAG TCACTATGAC ATCCRGGGA ATGATGEGG GAACCTACT
8101 GCATGTACCG AGTGTTTGAA GTAGTGTTA TCGAANTCC GGGTTGGG

Figura 11B

8201 TCTCAGCAGC TGTATGGTGG CTTTGGGGGA GCTCAACTC GCGCCCTTTT
8301 GTCRCCTTCC AGCTCGTCA GCTAGTGTGC TGGAAATCC CAACCGACAT
8401 ACCCTGCTATC TACACAGAGT GTATOGCTG ACANPCAGC AARATGGCT
8501 ACAGGGGTGT AAGGGTAAAR CAGTGGAGAT CCGAGTGGG
8601 CTGAGTCTGA CAGTGGAGT TAAANTCARR ATGCTTGGC GATCGGGCC
8701 ATGTGTATGG GCTGACTATC CCGCAANTGA AGNACTAGC CTTAGGTGTA
8801 CACTCTCOCA ATTAAGGAA CAGCGRAGA CTGCCATGCC CCAACPAAC
8901 CTACTGTGGT MAGANTCCR ALATGTTTT GCAACTATAG AIACTTCCAG
9001 TTTACTTTTA TCCTTTTAGG TTGCTATATA AGGGGTCCC CATCGAATTA
9101 TGTGCTGGG GACTCAGAA CTGCTGGACA TATCACTAC TCTGGATGG
9201 AGATAGGGT GCTAGTGAAC CRATCANTG ATGTCACCC GACATCAGC
9301 AAGTGGTCC CCGTTATGGA CTGCTATCT GTCACCCGA TCTTATACC
9401 TGGAGTATGC TCGAGTCCCT CACGCTTACA GCTGGAGGA CCTACACTG
9501 TATAACAAT GTGGAGTTC GBRATGTCAI CAAGTCCAG CTTAGGACTT
9601 AACATAGAAG ACRAAGATC NACGNGAAG ATGCTGCAI TCTCAAAA
9701 GGGACACTAA CTCACGGCTT GSCCTAGGCT CCEAATGAG GBRGGACATC
9801 TGAGGCTTT CTGTTTTGGT TTACNGTCAA GACTEAGATG AGCTCAATGA
9901 TCACTGGTA GTTCAGTTGA GTTCTTATC TCTGCTGACC TTGTTGCTAT
10001 TGATGTATG TGAATGCATA GAGGGAGGT TAAATGACGA GACCGCTATG
10101 GAAACTGATA GATGGTTTT TCCCTGCACT CCGENATCCA ACTATCMAA
10201 ATACAGTAG AACTCAGAGG TGCTTTCTT TCACTGATGA CAIACATCTG
10301 AGTTRACTGA AGCTCTAGAT TACTTTTCA TMACTGATGA CAGCTTANAG
10401 AGCAGTARCG GCTGCTGAAA ATGNTAGAA ATACATGAAI CAGCTTANAG
10501 ATATCTARCG GCTATCGTGA CAGGCACGA GCGAGTGGC CACCGCTGAC
10601 AAGGGTTAAC ACATGAGCAG TCGCTTGAZ ACTGGAATC TTITGCTGGA
10701 GTAGCTTANAG GACNAGSCAG TTGCTGCTT CCAANGGAA TGGGATTCAG
10801 CAGAGGCTTG TAGATGTTTT CCHTAAIGAT TCGAGCTTIG ACCCTCATG
10901 ACCTGTCTTA CAGCCTGAAA GAARAGGABA TCAAGGNAC AGGTAGACTT
11001 TCTAATCTCA AACGGGATG GCAATATTT TRAGGACANT GEARFGCCA
11101 TCTCCCAAG ATCTCAAGA AAGTCACAGG GGGGGGCCAG TCTTAAARAC
11201 AAGGGTTTT AAGTCTCCCT CAACTAATC GGCAGGACCA AGACACTGAT
11301 TGAATCTAAG AAGTACTGCC TTAATTTGNG ATATGAGACC ATCGCTTGT
11401 CTGCATAGA GGCTGAGAC CTCTGTCCG TATGTAATG ACCCTCATG
11501 AATCTTCAI TRAGTACCT ATGGGAGSTA TAGAGGGTA TGTGAGAA
11601 CAGAGTAGG ATGCTTGT TATGTCRAGG GRCANTCAG ACCNTAGCC
11701 GCTGTAGG TRACTAGAGA TTACTTTGTA ATCTTAGGC AAGGCTTACA
11801 TTTTGTCTA TTCANAAGA ATATTTTNG ATGCTACT TGTGTCCMA
11901 TGAACRAGG GCAGCATGCA GTAAIATGC TACAACATG GCTRAAGCA
12001 GTGATCACCC AATTTCTGAT CTCTTTGGC TTCACATCA ATTCRAACT
12101 GATGGCACT GTTGGCCGCT CCTAITGGGG GATGAAITA TCTGATATG
12201 TGAATCTAAG AGRATGATC TGGCTCACT AATGCCCTGA GAGNECTCC
12301 AGCGACCCCT ACTCAGCAAA TCTTGTATGT GTCCRAGCA TCRCTAGACT
GTCAGGGGA AGATCTATC ACNATCCCT ATCAGGATC AAGGAAAGGT 8300
GCNATCCCTG GTCCCTTAT CACCGGATA TCCAGTGNAT GACAGCCTTT 8400
GTCCGACAA CAGCAACAGA TGACAAGTIG CGAATGGAGA CATGCTTCCA 8500
CACCAATTGA GGATACAGG ATTCCTTCAI ACGGGTCTT GTCTGTGAT 8600
ATTGANTCA CACGGTTCAI GATGGNCT ATACAAATCC AACRCRACA 8700
ATCAACAT TGGATGGAT ACGAGNTC AAGTGTAGT CCTACCICTT 8800
TACTCCGGA GTTGGATGT ATGCTCAA TCAGTTCCAA TCTGGTAT 8900
GTTGAAACAT GCTGTGGTTT ATACGGTA CAGCCOAGC CGTCATTT 9000
CAAGTGGAT GCTTCAATG GGCANAAA CICTGGTCC GTCACIITG 9100
TGGCANTGG AGTCAGCTC ACAGTCACC GGAAGATGG AACCRATGC 9200
ATACCACAT GTGTAAATA GACATCGAA TTAAGAAA CGTAGGGTCC 9300
TGAATTCAC CTAGATAGC CGATAGTTAC CRYTAAGATA GTAGCCATC 9400
TGTCAANCA TCAAGCACG CRYTAANCA GATTAATCA ACCAATGAT 9500
ATCGGCCA CTCTCATAT CCATATCCA ATITTAATCA GEAATTTAT 9600
GGGAATTCG CTGACTCCA AAGTCATGA TAGGTTTT CAAVGTIAA 9700
NAGGAAAG TATTAACTT GGGATITAC ATGACAGCT CCAAGTGGT 9800
TAAATCNA ACCCATACT TCCATGGA GGAGACAC ACCTGATTC 9900
NATCATAA GATCTCAAC ATGATNTA CCTGACAT GAACTGGTT 10000
ACTATGAT CTAGGTATAC AGGCTTCA GGAAGATCA GATACATGT 10100
TTGATGACT GCTGAGCCT CTTTCACTT CTTACTGCA SCTGAGGGAT 10200
ACATGATTT TTTTCCAT TTTAGAAAT TCGECCACC CAAAGCTTA 10300
NAGGGGGA CTTTCCAT TTTCAGAA GTTGGCACC GATGCTTGA 10400
TATGTTGA TGAAGCTG ATGAAGST ATGCCATTT TGTGGAAATC 10500
CTTCCCTTG CATCTGAG ACRAATCCG GAATCTCA TCTTCAGGT 10600
GTAAATTTG CTTGCTTAT GCTCTTAG CTTGATGT ATCTACAAAT 10700
TGTGTAATG ATGTTGTA GTGACTTA CTTCCRAGG AACCGGTCA 10800
TTTCTAAA TGACTTACA ATGAGGGCA TGCCAAGTA TTGCTGAAA 10900
AGATGAGCA GATTTGACT AAGCCCTCC ACTCTAGC TGCTCAGGA 11000
CTACTCCCA AGCCAGTCC ACRAAGTAC CAGAACGTT AGAGCAGCA 11100
CTTCCGGA ATATGGAAG TTAGAGACA GTGATGCCAT TTRCAGCAC 11200
TTGACAGAG CTPAATGAG ATTAGCGAT TGCCCTCAT TTTCAGTGG 11300
CCCGCCGAC CTTRCGGCC ATATCCCTT ATATNAGTC CCCAATGATC 11400
CTGTGGACA TCAAGCCAT TCCATCTA TACTTGGCT CTTATGAG 11500
TAAANAA GGTACCAGC ACATGCCCT ACAACITTA GAACGGGAA 11700
TGATATGCC CATCACCTA AGCAATGA GACATTTT TCATCATT 11800
TCACTMAG GATGCGAAG ATGTGATTC TGGTCAGAGA CTATGTTGA 11900
TCAGAGAG TTATGCCGT TACTTGCAT ATTCCTGAA GTCCTAARA 12000
GACCCGGAT GTAGCTATAC CCTCTCRC AACRAGGAC CTCITATAA 12100
AGCAGGCTGT TGTGAGAA CATCGGTGAT CCAATACAT CATERATTC 12200
ATCAATAT GACACAAA CCGGGGACT CTTCAATCT AGACTGGCT 12300
CCTCAGAC ATACTGCA GGTITGCTT GATCCATAGT CCNACCCAA 12400

Figura 11C

12401 TGTTAAAGG ATTATTCAT GATGACAGTA AAGRAGGGA CGAGGGACTG
 12501 AACCTGGAT CMTAGTCA CAGGGCCAG AGAGTCTAT GCAGGCATGC 12500
 12601 ACCTCTCGAG TGAATACCAG ATTGTCCAT TATGACTATG AACRATTCAG
 12701 AAGAGTCRTG TTCAGTCCAG TTGGCCGAG CCTAAGAGG CCATATCTGG
 12801 ACTAGAACT AFGCAGSCC ACCATTTCG GCGTCAAGG ACATGTGCTA
 12901 TGCCAACTGG ATGATATGA CANGGAACA TCATCCTTGA GAGTCCGATA
 13001 GAGCCCNAG TCGATCCTG CGNTCTGCG TTAGNATAG AACAGTCTAC
 13101 GGCTAGGCA AGCCCAATG ATCCCTGGA CGAGTGAAG GTGATCACTC
 13201 CAAGTGAAT ACCTCAGTAC ATCCCTGTC GGNATGCGA GGTATACCAC
 13301 TAACTTAT APACCAACA GGNATGCTC TAGGTTGGG TGTITAGAA
 13401 TCTTCAGGC GAARCAATG GTTCCGTGAT CCGATGATA GATCATCCCA
 13501 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 13601 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 13701 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 13801 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 13901 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 14001 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 14101 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 14201 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 14301 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 14401 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 14501 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 14601 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 14701 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 14801 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 14901 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 15001 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 15101 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 15201 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 15301 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 15401 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 15501 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 15601 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 15701 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 15801 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 15901 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 16001 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 16101 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 16201 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 16301 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 16401 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT
 16501 CACCCCACT ATATCACAT TTAGCTAAT CCACAGCCT ATCTATGAT

Figura 11D

16601	GGATAACGCA	GGARAGRACA	TGTGAGCAAA	AGGCCAGCAA	AAGCCAGGGA	ACCGTAAAA	GGSCCGGTTG	CTGGGGTTTT	TCCATAGGCT	CGGCCCCCTT	16700
16701	GACGAGCTC	ACAAAATCG	ACGCTCAAGT	CAGAGGTGGC	GAAACCCGAC	AGRACIATRA	AGRATACCACG	CGTTCCCCCT	TGGARCTCC	TGGARCTCC	16800
16801	CTCCTGTTCC	GACCCCTGCC	CTTACCGGAT	ACCTGTCCGC	CTTTCTCCCT	TOGGGRACCG	TGGCGCTTTC	TCAATGCTCA	CGCTETAGGT	ATCTCAGTTC	16900
16901	GGTGTAGGTC	GTTTGGCTCCA	AGCTGGGCTG	TGTCACRGRA	CCCCCGGTTG	AGCCCGACCG	CTSCGCTTA	TCCGGTAACT	ATCGTCTTGA	GTCCAAACCCG	17000
17001	GTAAGACAGG	ACTTATCGCC	ACTGGCAGCA	GCCACTGGTA	ACRGGATTAG	CAGAGCGAGG	TATGTAGGCG	GTGCTACRGA	GTTCITGAAG	TGGTGGCCTA	17100
17101	ACTACGGGCTA	CACIAGRAGG	ACAGTATTGG	GTAFTGCGC	TCTGTGAAG	CCAGTTACCT	TCSGNAARAG	AGTTGGTAGC	TCTTGTATCCG	GCAACAAAC	17200
17201	CACCGCTGGT	AGCGGTGGTT	TTTTTGTGTTG	CAAGCAGCAG	ATTACCGGCA	GAARAAAGG	ATCTCAARAG	GATCCCTTGA	TCTTTTCTAC	GGGTTCTGAC	17300
17301	GCTCAGTGG	ACGAAACTC	ACGTTAAGGG	ATTTTGGTCA	TGAGATTATC	AAARAGATC	TTCACCTAGA	TCCTTTTAAA	TTAAARATGA	AGTTTTAAAT	17400
17401	CAATCTAAG	TATATATGAG	TAACTTGGT	GTCACRGTTA	CCNATGCTTA	ATCAGTGAGG	CACCTATCTC	AGCGATCTGT	CTATTTCTGT	CAIACCATAT	17500
17501	TGCTGACTG	CCCGTCCGTG	AGATACTAC	GATACGGGAG	GGCTTACCAT	CTGGCCCCAG	TGTGTCAATG	ATACCGGAG	ACCCAGGCTC	ACCGGCTCCA	17600
17601	GAITTTATCAG	CAAIANACCA	GCCRCGCGA	ASGGCCGAGC	GCAGAACTGG	TCCTGCAACT	TTATCCGCCT	CCATCCAGTC	TATTAATTTGT	TGCCGGGAG	17700
17701	CTAGAGTAG	TAGTTCCGCA	GTTAATAGTT	TGGRCARCGT	TGTTGCAATT	GCTACAGGCA	TGCTGTGTC	ACGCTCGTCG	TTTGTATGG	CTTCATTCAG	17800
17801	CTCCGGTTC	CAACGATCAA	GGCGAGTTAC	ATGATCCCC	ATGTTGTGNA	AAAAGSGGT	TAGTCTCTTC	GGTCTCCGA	TCGTTGTGAG	ARGTAAAGTTG	17900
17901	GCCGCACTGT	TATCACTCAT	GCTTATGCA	GCAGTGCATA	ATTCCTTAC	TGTCATGCCA	TCCGTAGAT	GCTTTTCTGT	GACTGGTAG	TACTCAACCA	18000
18001	AGTCAITCTG	AGNATAGTGT	ATGGGGCGAC	CGAGTTGCTC	TTGCCCGCG	TCARATCGGG	ATAATACCGC	GCCACATAGC	AGAACTTTAA	ARGTGTCTCAT	18100
18101	CATTTGGAAA	CGTTCYTCCG	GGCGAAACT	CTCARAGGATC	TTACCCTGT	TGAGATCCAG	TTCGATGTAA	CCCACCTGTG	CACCCAACTG	ATCTTCAGCA	18200
18201	TCITTTACTT	TCACCAGCGT	TTCTGGGTGA	GCARAAACAG	GANGGCAAAA	TGCCGCAAAA	AAGGGAATAA	GGGGGACACG	GAAATGTGTA	ATRCTCATAC	18300
18301	TCITTCCTTT	CCCAGAAAG	TGACGATTT	ATCAGGGTTA	TGTTCTCATG	AGCGGATACA	TATTTGNAITG	TATTTAGAAA	ANTAARACAAA	TAGGGGTTCC	18400
18401	GCGCACATTT	CCCAGAAAG	TGACGATTT	ATCAGGGTTA	GTTATATTTT	TGTTAAATTT	CGCGTTAAAT	TTTTTGTAAA	TCAGTCTATT	TTTTTAACCAA	18500
18501	TAGGCCGAAA	TCGGCAAAAT	CCCTTATARA	TCARAAAGAT	AGACCGAGAT	AGGTTGAGT	GTTGTTCCAG	TTTTGGAACAA	GAGTECRACTA	TTAAGAGACG	18600
18601	TGGACTCCAA	CGTCAARAGG	CGAANAACCG	TCPATCAGGG	CGATGGCCCA	CTACGTTGAC	CATCACCTTA	ATCAAGTTTT	TTGGGTCGA	GGTCCCGTAA	18700
18701	AGCACTAAAT	CGGAACCCCTA	AGGGAGCCC	CGGATTTAGA	GCTTGACGGG	GARAGCCGGC	GAAACGTTG	AGAAAGGAAAG	GGAAGAARGC	GAAAGGAGCG	18800
18801	GCGCTAGGG	CGCTGGCAAG	TGTAGGGTGC	ACGCTGCGCG	TAACCAACCAC	ACCCGCGCGG	CTTAAITGEGC	CGCTACAGGG	CGCGTCCCAT	TGCGCAATCA	18900
18901	GGCTGCGCAA	CTGTTGGGAR	GGGGGATCGG	TGCGGGCCCTC	TTCCGTATTA	CGCCAGCCAC	CGCGGTTG				18967

Figura 11E

```

1 ATGCGAGTCG Tgattgacct actggtcttg gctgttggte cggctactc 50
101 gaggaaacttg ggtttccagct accctggagc aagacaagtg tgtcactgtt 100
201 tgatagacct gctgaggtga ggaaggttg ttacaatgca gttctcactc 150
301 gaagagaacg aaggggacaa tgcgtgcaag cgcacttatt ctgatgagg 200
401 ccaaatccac ttgtgccaaa tccatgagtt tgtttgaggt tgatcagacc 250
501 aatttggact accgacatta agactctcaa gtttggatgct ctgtcaggct 300
601 gtgcaaaactg cggtagactt tggtaecagt tacatcgttg agatgaaac 350
701 ggcagagtgg aagtggcggg gtgtggagag agatgcatca tcttctcga 400
801 ggaaggctcc ttgaaaacag ctcttacttg cgaatgagg gttacaagg 450
901 agagtgaat tgtcagcttt gacactaaag gggacatcct acaaatatg 500
1001 ctgtttgtat gcaggcga 9tgtcaaaag gagccccctg caggattcca 550
1101 tacagttaac cccatcgctt caaaccatga tgatgaagtg ctgattgagg 600
1201 cgtctcactt accagtggca caaagaggga agtccaatag gaaagtgtt 650
1301 cctyggattt cagctccgct ggaagggtct tcacttcggt tgggaaagga 700
1401 ctggataaca aaggtcatca tggggggcgt acctatatgg gttggcaatca 750
1458

```

Figuras 12A-12B
 Secuencias del gen Env de YFV 17D204 expresado en MV

```

1 ATGAGagtg tgtttgctg gctattgctt | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100
101 gagcaacatg ggtggattg gtctcgag | 9cagcagctg cgtgactatc | cagcttacag
201 ggtcaacctg gcagaggtcc gcagttattg | ctatttgct accgtcagcg | cagcttacag
301 aaacgtgctg acccagcttt tgtgtgcaga | caaggagtgg tggacagggg | tggacagggg
401 ccaaatctgc ctgctctacc aagpcaatag | gaagaacctt cttgaaagag | cttgaaagag
501 gtgcacgga aactactcca cacaggctgg | agccactcag gcaggagat | gcaggagat
601 ggagaggtga cagtggactg tgaaccacgg | tcagggattg acacccaatg | acacccaatg
701 ggttcatgga cctcaacctc ccttgagaga | gtgctggaag tactgtgtgg | tactgtgtgg
801 gtctgtgata gcattgggct cacaaagagg | agctctgcat caagctttgg | caagctttgg
901 ggtcatttga agtataagat gaagatggaa | aaattgcaat tgaagggaac | tgaagggaac
1001 acacaggtca cggcactgtg gtgttggaa | tgcagtacac tggcacggat | tggcacggat
1101 gccagtgggc agattggtca ctgtcaacc | ttttggttca gtggccacgg | gtggccacgg
1201 atagtgtggg gcagaggaga acaacagatc | aatcacattt ggacaagtc | ggacaagtc
1301 gactagccgc tctaggagac acagcttggg | actttggatc agttggaggg | agttggaggg
1401 ccgctcactg ttcggaggca tgccttggat | aacgcaagga ttgctggggg | ttgctggggg

```

Figura 12C
Gen Env de WNV expresado en MV

```

1 ATGagggtcca tagctctcac tagctctcac gtttctctgca gttggaggag ttctgtctctt
101 ggcaagagct gagatgtgga agtggagtgt tcatacaca tgaatgtggag
201 caagatcatt cagaaagctc ataaggaagg agtgtgcgtt ctacgatcag
301 actcttttga aggagaatgg tglggacctt agtgtcgtgg ttgagaaca
401 aattggaat tggctggaag gcttggggaa agagtatttt atttgcacca
501 tccgactcag aatcgcgctt ggaatagctt agaagtggag gattttggat
601 actgaatgt actcgaagat cattggaacg gctgtcaaga acaacttggc
701 ggaagcttga aaggccagtt ctggtggaag tcaaatcatg taegtgcct
801 accagtcaca ctggcgggac caagaaagcaa tcacaatcgg agacttgggt
901 ttcgattact gccagggaac tacggtcacc ctgagtgaga gcttggggaca
1001 attggtgctg caggagctgc accttaccac cactgcgcta ccaacttgac
1101 gacctAATGA
      | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100
      | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 | 600 | 700 | 800 | 900 | 1000 | 1100

```

Figura 12D
Gen NS1 de WNV expresado en MV

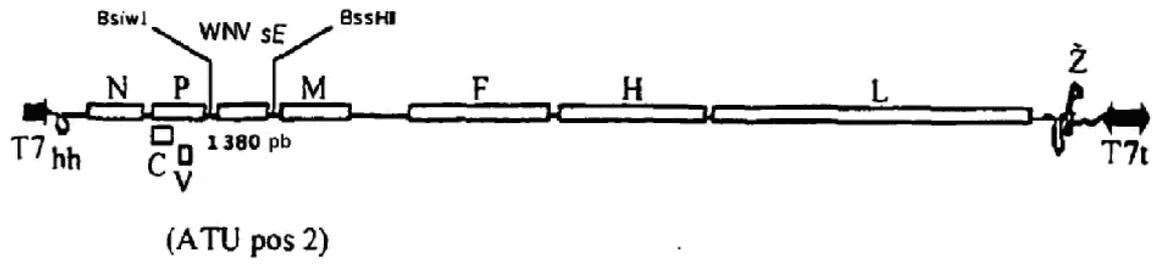


Figura 13: pTM-MV Schw-sEWNV

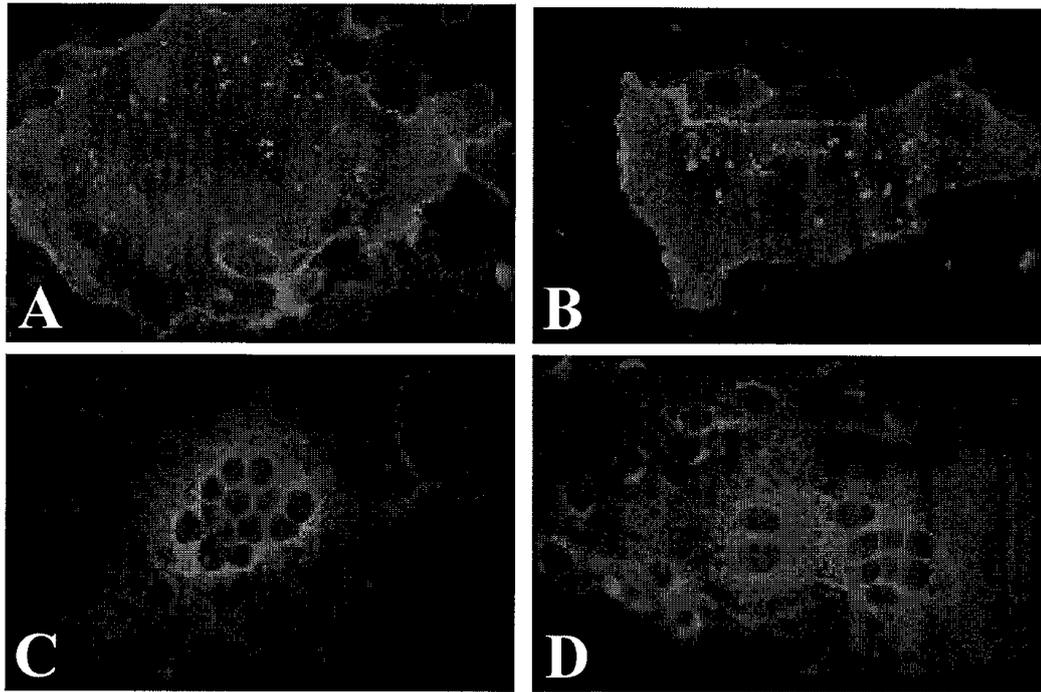


Figura 14: Expresión de la proteína sE de WNV en sincitios inducidos por MV

Serología anti-MV 1 mes después de la primera inyección

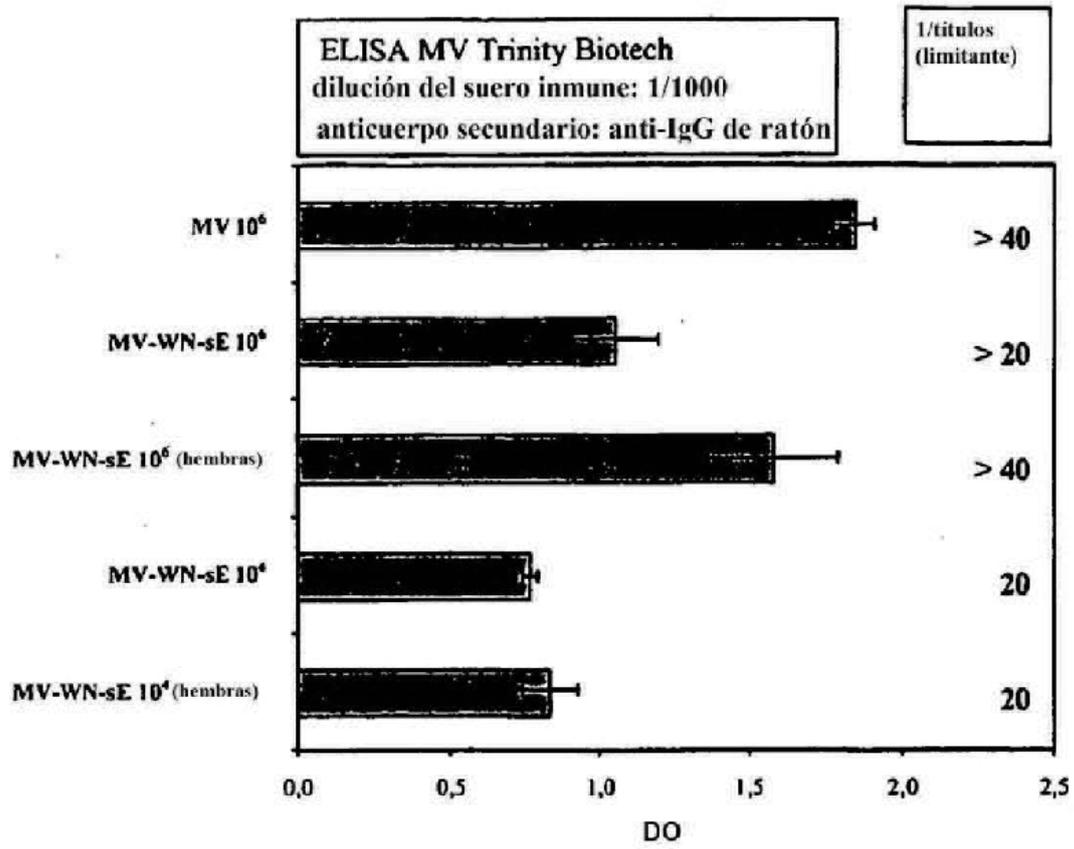


Figura 15

gp140HIV_{89.6p}

atgagagtgaaggagaaatcagcacttgggagatgggggtggagatggggcaccatgctcctgggagttgatgatctgtagtgc
 tacagaaaattgtgggtcacagtclattatggggfaccigtgtggagagaagcaaccaccactctatfttggatcagatgclaaagcc
 tatgatacagagggtacataatgtttgggccacacatgcctgtgtacccacagaccccaaccacaagaagtagtattgggaaatgtgac
 agaaaattttaacatgtggaaaaataacalggtagalcagatgcatgaggalataalcagtttatgggalgaaagcctaaagccatgtgta
 aaattaaccccactctgtgttactttaaattgcactaattgaatatacctaagaataactactaactcactagtagcagctggggaatgatgg
 aggaaggagaaataaaaaattgctctttctatacaccacaagcatalaagaaalaggtaaaagaaagaatatgcacttttaatagacttgal
 gtagtaccagtaaaaaatactagtaataactaagiataggttaataagttgtaaacacctcagtcattacacaggcctgtccaagggtatcctt
 cagccaaftccatacattattgtgtccggctgggfttgcgatacctaaagtgaacaataagacattcaatggatcaggaccatgcacaa
 atgicagcacagtacaatgtacacatggaattaggccagtggtgcaactcaactgctgttaaatggcagctcagcagaagaagacata
 gtaattagatctgaagalitcacagacaatgtaaaaccataatagtagcctaaatgaatctgtagtaattaattgtacaagaccaacaa
 caatacagagaaagggtatctataggaccagggagagcattttatgcaagaagaacataalaggagalataagacaagcacattgta
 acattagtagagcaaaatggaataacacttacaacagalagttataaaattaagagaaaaatttaggaataaaacaatagcctttaatcaa
 tctcaggaggggaccagaaaattgtaatgcacagtttaattgtggaggggaattttctactgtaatacagcacaactgtttaatagtagt
 tggaaigtgtcaggaggacaaatggcactgaaggaaatgacataatcacacitccaatgcagaalaaaacaaattataaatatgtggca
 gaaagtaggaaaagcaatgtatgccctcccacacaggacaaattagatgttcatcaaatattacagggtgctactaacaagagatg
 gaggtaatagtagtactgagactgagactgagatctcagacctggaggaggagatagagggacaattggagaagtgaattatataaatat
 aaagtagtaagaattgaaccaataggagtagcaccaccagggcaaagagaagaacagtgcaagagaaaaagagcagtgaggaa
 taggagctgtgtccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcagtgacgctgacggtacaggccaggctatt
 attgtctggatagtgtagcagcagacaacatctgctgagggctattgaggcgcaacagaatattgtgcgactcagactctggggcatca
 agcagctccaggcaagagctcctggccttggaaagatacctaagggatcaacagctcatgggaatttggggtgctctggaaaactcatt
 tgcaccacttctgtccttggaaigttagttggagtaalaalctgtggatgatatttggataacatgacctggatggagtgaggaaagag
 aaattgacaattacagactatataatgacttacttgaataatcgcaaacccaacaagaaaagaatgaaaagaattattggaattgga
 laaatgggcaagtttgggaattggtttgacataacaaactggctgtggtatataagataa

Figura 16A

MRVKEKYQHLWRWGWRWGTMLLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWREATTLF
CASDAKAYDTEVHNVWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTENFNMWKNNMVDQMHE
DIISLWDESLKPCVKLTPLCVTLNCTNLNITKNNTTLTSSSWGMMEEGEIKNCSFYITT
SIRNKVKKEYALFNRLDVVPVKNTSNTKYRLISCNTSVITQACPKVSFQPIPIHYCVPA
GFAILKCNNKTFNGSGPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEEDIVIRSEDFTDN
VKTIVQLNESVVINCTRPNNNTRERLSIGPGRIFYARRNIIGDIRQAHCNISRAKWNN
TLQQIVIKLREKFRNKTIAFNQSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFYCNTAQLFNSTWNVAG
GTNGTEGNDIITLQCRIKQIINMWQKVGKAMYAPPITGQIRCSSNITGLLLTRDGGNST
ETETEIFRPGGDMRDNWRSELYKYKVVRIEPIGVAPTRAKRRTVQREKRAVGIGAV
FLGFLGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQNMLRLTVWGIK
QLQARVLALERYLRDQQLMGIWGCSGKLICTTSVPWNVSWSNKSVDDIWNNMTWM
EWEREIDNYTDYIYDLLEKSQTQQEKNEKELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIR

Figura 16B

gp160HIV_{89.6p}

atgagagtgaaggagaaalalcagcactlgtggagatgggggtggagatggggcaccatgclccctgggatgtgatctgtagtgc
 tacagaaaaattgtgggtcacagctctattatggggtacctgtgtggagagaagcaaccaccactctatitgtgcatcagatgctaaagcc
 tatgatacagagggtacataatgttgggccacacatgccigtgtaccacagaccccaaccacagaagagtagtattgggaaatgtgac
 agaaaatttaacatgtggaaaaataacatgtagatcagatgcatgaggataataatcagttatgggatgaaagccctaaagccatgtgta
 aaattaaccccactctgtgtacttfaaattgcactaattgaatatacactaagaatacactactaactcactagtagcagctggggaatgatgg
 aggaaggagaaataaaaaattgclctttctatataccacaaagcataagaataaaggtaaaagaaagaalatgcacittttaatagacttgat
 gtagtaccagtaaaaaactagtaactaagatataaggtaataaagtgtaacacctcagtcattacacaggccctgccaaaggatcctt
 cagccaatcccatacattatgtgtcccggctgggttgcgatactaaagtgtaacataagacattcaatggatcaggaccatgcacaa
 atgtcagcacagtaacatgtacacatggaattaggccagtgtgtcaactcaactgctgttaaatggcagctctagcagaagaagacata
 gtaattagatctgaagattcaca gacaatgtaaaaccataatgtacagctaaatgaalctgtagtaattaatgtacaagaccaacaa
 caatacagaagaaaaggttatctataggaccaggagagcattttatgcaagaagaacataataggagatalaagacaagcacattgta
 acattagtagagcaaaaaggtaaacactttacaacagatagttataaaatfaagagaaaaaatttaggaataaaacaatagccfttaacaa
 tccctcaggaggggaccagaaatgtaalgcacagtttaattgtggaggggaattttctactgtaatacagcacaactgtttaatagfact
 tggaatgttctggagggacaaatggcactgaaggaaatgacataatcacactccaatgcagaataaaacaaattataaatatgtggca
 gaaagtaggaaaagcaatgtatccccctccatcacaggacaaattagatgttcatcaaatattacagggtgctactaacaagagatg
 gagtaatagtagtactgagactgagactgagatctcagacctggaggaggagatagagggacaattggagaagtgaattatataaatat
 aaagtagtaagaattgaaccaataggagtagcaccaccaggggcaagagaagaacagtgcaaaagagaaaaagagcagtgaggaa
 laggagctgtgtccttgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcagtgacgctgacgggiacaggccaggctatt
 attgtctggatagtgagcagcagaacaalctgctgagggtatfagggcgcaacagaatatgtgcgactcacagictggggcatca
 agcagctccaggcaagagictggcictggaaagatacctaagggaalcaacagctcatgggaafttggggtgclctggaaaactcatt
 tgcaccactctgtgaccttggaaatgtagtggagtaataaatctgtggatgatattggaataacatgacctggatggaatgggaaagag
 aaattgacaattacagactatataatgacttacttgaaaaalcgcaacc caacaa gaaaaaatgaaaaagaattattggaaltgga
 taaatgggcaagtttgtggaattggtttgacataacaaactggctgtgtatataagattatcataatgatagtaggaggttgataggttt
 aagaalagttttgtgtactttctatagtaaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccctcccagcctcga gggg
 acccgacaggcccgaaggaaacagaagaagaagggtggagagagagacagagacagatccgggccatcagtgacggatccttggc
 acttatctgggacgatctgcggagcctgtgcclctcagctaccaccgcttgagagacttactcttgatgtaacgaggattgtggaactc
 tgggacgca ggggggtgggaagccctcaaatattggtggaatccttacagatggagtcaggaaactaaagaatagtgctgttagctg
 ctacaatalgggtggagctattccatgaggcgggtccaggccgtctggagatctgcgacagagactcttgcgggagcgtggggagact
 tatgggagactcttaggagagggtggaagatggalactcgaalcccaggaggattagacaagggttggagctcactctctgtga

Figura 16C

MRVKEKYQHLWRWGWRWGTMLLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWREATTTLF
CASDAKAYDTEVHNVWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTENFNMWKNNMVDQMHE
DIISLWDESLKPCVKLTPLCVTLNCTNLNITKNNTNLTSSSWGMMEEGEIKNCSFYITT
SIRNKVKKEYALFNRLDVVPVKNTSNTKYRLISCNTSVITQACPKVSFQPIPIHYCVPA
GFAILKCNNKTFNGSGPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIVIRSEDFTDN
VKTIIVQLNESVVINCTRPNNNTRERLSIGPGRIFYARRNiIGDIRQAHCNISRAKWNN
TLQQIVIKLREKFRNKTIAFNQSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFYCNTAQLFNSTWNVAG
GTNGTEGNDIITLQCRIKQIINMWQKVGKAMYAPPITGQIRCSSNITGLLLTRDGGNST
ETETEIFRPGGGDMRDNRSELYKYKVVRIPIGVAPTRAKRRTVQREKRAVGIGAV
FLGFLGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQNMLRLTVWGIK
QLQARVLALERYLRDQQLMGIWGC SGKLICTTSVPWNVSWSNKSVDDIWNNMTWM
EWEREIDNYTDYTYDLLEKSQTQQEKNEKELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIRLFI
MIVGGLIGLRIVFAVLSIVNRVRQGYSPFSFQTLTPASRGPDRPEGTEEEGGERDRDRS
GPSVNGSLALIWDDLRSCLFSYHRLRDLIVTRIVELLGRRGWEALKYWWNLLQY
WSQELKNSAVSLLQYGWSYFHEAVQAVWRSATETLAGAWGDLWETLRRGGRWIL
AIPRRIRQGLELTL

Figura 16D

gp140V3_{HIV}

atgagagtgaaggagaaatacagcacttgtggagatgggggtggagagggggcaccatgctccttgggalgttgatgactgtagtg
 tacagaaaaattgtgggtcacagtctattatggggctacctgtgtggagagaagcaaccaccactctatfttgtgcatcagatgctaaagcc
 tatgatacagaggtacataatgfttgggccacacatgccctgtgtacccacagacccaaccacaaagaagtaglattgggaaalgtgac
 agaaaatftaacatgtggaaaaataacatggtagatcagatgcatgaggatataalcagttatgggatgaaagcciaaagccalgtgla
 aaattaacccccactctgtgtactttaattgcactaattgaalacactaagaataactactaatecactagtagcagctggggaatgatgg
 aggaaggagaaataaaaaattgctctttctataccacaagcataagaalaaaggtaaagaaagaatgacactfttaatagactgat
 gtagtaccagtaaaaaatactagtaataclaagataggtaataagftgtaacacctcagtcattacacagggcctgtccaaaggtaiccttt
 cagccaattcccatacattattgtgtcccggctgggttgcgatactaaagtgaacaataagacattcaatggatcaggaccatgcacaa
 atgtcagcacagtacaatgtacacatggaattaggccagtggtgtcaactcaactgctgtaaatggcagictagcagaagaacata
 gtaattagatctgaagattcacagacaatgftaaaaccalaalagtacagctaaatgaatctgtagtaaftaattgtacaagacccaacaa
 caatgctgcagaattggataaatgggcaagtgtgcagacaagcacattgtaacattagtagagcaaaatggaataacactttacaac
 agatagttataaaattaaagaaaaatttaggaataaaacaatagcctfttaalcaatcctcaggaggggaccagaaattgtaatgcaca
 gtttaattgtggaggggaatttttclactglaafacagcacaactgttlaalagtacttggaaigtgtgctggagggacaaatggcaictgaag
 gaaalgacataatcacactccaatgcagaataaaacaaattataaatatgtggcagaaagtaggaaaagcaatglatgccccccatca
 caggacaaattaagatgttcatcaaatattacagggctgctactaacaagagatggaggtaatagtactgagactgagactgagatctca
 gacctggaggaggagatagagggacaattggagaagtgaattatataaatataaagtagtaagaattgaaccaataggagtagcacc
 caccagggcaagagaagaacagtgcaaaagagaaaaagagcagtgggaaataggagctgtgttccttgggtcttgggagcagcag
 gaagcactatgggcgcagcgtcagtgacgctgacgggtacaggccaggctattatgtctggtatagtgcagcagcagaacaatctgct
 gagggtattgaggcgcaacagaatattgttgcgactcacagcttggggcatcaagcagctccaggcaagagctcctggctctggaaag
 atacctaagggatcaacagctcatgggaattggggtgctctggaaaactcattgcaccacttctgtgcttggaaatgttagttggagta
 ataaatctgtggatgatatttggaaataacatgacctggatggagtgggaaagagaattgacaattacacagactatataatgacttactt
 gaaaaalcgcaaacccaacaagaaaagaatgaaaaagaattattggaattggataaalgggcaagtttgggaattggttgacataaca
 aactggctgtggtatataagataa

Figura 16E

MRVKEKYQHLWRWGWRWGTMLLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWREATTLF
CASDAKAYDTEVHNVWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTENFNMWKNNMVDQMHE
DHSLWDESLKPCVKLTPLCVTLNCTNLNITKNTTNTLSSSWGMMEEGEIKNCSFYITT
SIRNKVKKEYALFNRLDVVPVKNTSNTKYRLISCNTSVITQACPKVSFQPIPIHYCVPA
GFAILKCNNKTFNGSGPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGLSLAEEDIVIRSEDFTDN
VKTIIVQLNESVVINCTRPNNNAEELDKWASAAARQAHCNISRAKWNNTLQQIVIKLR
EKFRNKTIAFNQSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFYCNTAQLFNSTWNVAGGTNGTEGND
IITLQCRIKQIINMWQKVGKAMYAPPITGQIRCSSNITGLLLTRDGGNSTETETEIFRPG
GGDMRDNWRSELYKYKVVRJEPIGVAPTRAKRRTVQREKRAVGIGAVFLGFLGAAG
STMGAASVTLTVQARLLLSGIVQQQNLLRAIEAQQNMLRLTVWGKQLQARVLAL
ERYLRDQQLMGIWGC SGKLICTTSVPWNVSWSNKSVDDIWNNMTWMEWEREIDNY
TDYIYDLLEKSQTQQEKNEKELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIR

Figura 16F

gp160 Δ V3_{HIV}

atgagagtgaaggagaaatcagcactgtggagatgggggtggagatggggcaccatgctcctgggatgtgatgatctgtagtgc
tacagaaaaatgtgggtcacagtctattatggggtacctgtgtggagagaagcaaccaccactctatttgtgatcagatgctaaagcc
tatgatacagaggtacataatgfttgggccacacatgcctgtgtaccacagacccaaccacaagaagtagtattgggaaatgtgac
agaaaaatftaacatgtggaaaaaacaatggtatgatcagatgcatgaggatataatcagttatgggatgaaagcctaaagccatgtgta
aaattaaccccactctgtgttactttaaatgcactaattgaatacactaagaactactactaactcactagtagcagctggggaatgatgg
aggaaggagaaataaaaaattgctctttctataccacaagcataagaataaggtaaaagaagaatgcacttttaatagactgat
gtagtaccagtaaaaaatactagtaatacactaagataggtaataagttgtaaacacctcagtcattacacaggcctgtccaaggatccttt
cagccaattcccatacattattgtgtccggctgggttgcgatactaaagtgaacaataagacatccaatggatcaggaccatgcacaa
atgtcagcacagtacaatgtacacatggaattaggccagtggtgtcaactcaactgctgttaaalggcagcttagcagaagaagacata
gtaattagatcigaagattcacagacaatgttaaaaccataatgtacagctaaatgaatctgtagtaattaattgtacaagaccaacaa
caatgctgcagaattggataaatgggcaagtgctgcaagacaagcacattgtaacattagtagagcaaaatggaataacactttacaac
agatagttataaaatagagaaaaatftaggaataaaaacaatagccttaatacctcagggaggggacccaagaaatgtaatgcaca
gttttaattgtggaggggaatfttctactglaatacagcacaactgttaatagtacttggaaatgttgcggagggacaaatggcactgaag
gaaatgacalaalcacactccaatgcagaataaaacaaattataaatatgtggcagaaagtaggaaaagcaatgtatgcccccccacac
caggacaaatlagatgttcatcaaatattacagggtgctactaacaagagatggaggttaatagtactgagactgagactgagacttca
gacctggaggaggagataigagggacaattggaagaatgaaatataaaatagtagtaagaattgaaccaataggagtagcacc
caccagggcaaaagagaagaacagtgcaaaagagaaaaagagcagtggaataggagctgtgttcttgggttcttgggagcagcag
gaagcactatgggcgcagcgtcagtgacgctgacgggtacaggccaggctattattgtctggtatagtgcagcagcagaacaatctgct
gagggctattgagggcgaacagaatattgtcgaactcacagctcggggcatcaagcagctccaggcaagagctcctggctcggaaag
atacctaagggatcaacagctcatgggaatttggggtgctctggaaaactcattgcaaccactctgtgccttggaaatgttagttggagta
ataaatctgtggatgatatttgaataacatgacctggatggagtgaggaaagagaattgacaattacacagactatataatgacttactt
gaaaaatcgcaaacccaacaagaaaagaatgaaaaagaattattggaattggataaatggcaagtttggaaatggttgacataaca
aactggctgtggtatataagattattcataatgatagtaggaggcttgatagggttaagaatagttttgctgtactttctatagtaaatagatt
aggcagggatattcaccattatcgttcagaccctcctcccagcctcagggggacccgacaggcccgaaggaaacagaagaagaagg
tggagagagagacagagacagatccgggtccatcagtgaaaggatccttggcacttaactgggacgatctgcggagcctgtgcctctc
agctaccaccgcttgagagacttactcttgattgtaacgaggattgtggaactctgggacgcaggggggtggaaagccctcaaatattg
gtggaatcctctacagattggagtcaggaactaaagaatagtcgttagcttgcacaatatgggtggagctatttccatgaggcggc
caggccgtctggagatctgcgacagagactctgcgggcgcgtggggagacttatgggagactcttaggagaggtggaagatggata
ctcgaatccccaggaggattagacaaaggcctgagctcactctctgtga

Figura 16G

MRVKEKYQHLWRWGWRWGTMLLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWREATTTLF
 CASDAKAYDTEVHNVWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTENFNMWKNNMVDQMHE
 DIISLWDESLKPCVKLTPLCVTLNCTNLNITKNTTNLTSSSWGMMEEGEIKNCSFYITT
 SIRNKVKKEYALFNRLDVVPVKNTSNTKYRLISCNTSVITQACPKVSFQPIPIHYCVPA
 GFAILKCNKTFNGSGPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGSLAEEDIVRSEDFTDN
 VKTIIVQLNESVVINCTRPNNNAEELDKWASAARQAHCNISRAKWNNTLQQIVIKLR
 EKFRNKTIAFNQSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFYCNTAQLFNSTWNVAGGTNGTEGND
 IITLQCRKQIINMWQKVGKAMYAPPITGQIRCSSNITGLLLTRDGGNSTETETEIFRPG
 GGDMRDNWRSELYKYKVVRIEPIGVAPTRAKRRTVQREKRAVGIGAVFLGFLGAAG
 STMGAASVTLTVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIEAQONMLRLTVWGIKQLQARVLAL
 ERYLRDQQLMGIWGC SGKLICTTSPWNVSWSNKSVDDIWNNMTWMEWEREIDNY
 TDYIYDLLEKSQTQQEKNEKELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIRLFIMIVGGLIGL
 RIVFAVLSIVNRVRQGYSPLSFQTLLPASRGPDRPEGTEEEGGERDRDRSGPSVNGSLA
 LIWDDLRSCLFSYHRLRDLLLIVTRIVELLGRRGWEALKYWWNLLQYWSQELKNS
 AVSLLQYGWSYFHEAVQAVWRSATETLAGAWGDLWETLRRGGRWILAI PRIRQGL
 ELTLL

Figura 16H

gp140_{HRV} ΔVIV2

atgagagigaaggagaaatacagcacttgtggagatgggggtggagatggggcaccatgctccttgggatgttgatgatctgtagtgc
 tacagaaaaattgiggcicacagtcclattatgggggtacctgtgtggagagaagcaaccaccactctatfttgtgcatcagatgctaaagcc
 talgatacagagggtacataatgrrtgggcccacacatgcctgtgtacccacagaccccaaccacaagaagtagtattgggaaatgtgac
 agaaaatltaacatgtgaaaaalaacatggtagatcagatgcatgaggatataatcagtttatgggatgaaagcctaagccatgtgta
 aaataaccccactcigtgttactttaaattgtaacacctcagtcattacacaggccigtccaaaggtalccttcagccaaltcccalacatt
 atgtgtcccggctgggttgcgalactaaagttaacaataagacattcaatggatcaggaccatgcacaatgtcagcagagtacaat
 gtacacalggaaataggccagtggtgtcaacicaactgctgttaaaggcagcttagcagaagaagacatagtaatta gatctgaagatt
 cacagacaatgtaaaacataatagtacagctaaatgaatctgtagttaaftaattgtacaagaccacaacaalacaagagaaaggfla
 lclataggaccaggagagcattttatgcaagaagaacataataggagataagacaaagcaccattgaacattagtagcaaaatg
 gaataacactttacaacagatagttataaaattaagagaaaaatftaggaataaaacaatagcctttaatcaatccicaggaggggaccca
 gaaattgtaatgcacagtttaattgtggaggggaatfttctactgtaatacagcacaaactgtttaatgacttggaaatgttctggagggga
 caaatggcactgaaggaaatgacalaatcacactccaalgcagaataaaacaaffataaaatgtggcagaaagtaggaaaagcaat
 gtatgcccccccacacaggacaaaatfagatgttcatcaataftacaggcctgctactaacaagagatggaggttaatgactgagac
 lgagactgagatcttcagacctggaggaggagatalgagggacaattggagaa gtagaattatataaatataaagtagtaagaattgaac
 caataggagtagcaccaccaggcacaagaagaacagtgcaaaagagaaaaaagagcagtgaggaaataggagctgtgttccttg
 gttcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcagcgtcagtgacgctgacggtacaggccaggctattattgtctggtatagtgag
 cagcagaacaatctgclgagggtattgagcgcacaagaalatgttgcgactcaca gcttggggcatcaagcagctccaggcaaga
 gtcttgctctggaaa galacctaagggatcaacagctcatgggaatttgggggttctctggaaaactcatttgaccacttctgtgcctt
 ggaatgttagttggagtaataaatctgtggatgatatttggaaataacatgacctggatggagtgaggaaagagaaattgacaattacacag
 actatataatgacttacttgaaaaatgcacaacccaacaagaaaagaatgaaaaagaaltattggaattggataaatgggcaagtttgtg
 gaattggttgacalaacaaactggctgtggtatataagatga

Figura 16l

MRVKEKYQHLWRWGWRWGTMLLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWREATTLF
CASDAKAYDTEVHNWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTENFNMWKNNMVDQMHE
DIISLWDESLKPCVKLTPLCVTLNCNTSVITQACPKVSFQPIPIHYCVFAGFAILKCNNK
TFNGSGPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEEDIVRSEDFTDNVKTIIVQLNES
VVINCTRPNNNTRERLSIGPGRFYARRNIIGDIRQAHCNISRAKWNNTLQQIVIKLRE
KFRNKTLAFNQSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFYCNTAQLFNSTWNVAGGTNGTEGNDI
TLQCRIKQIINMWQKVGKAMYAPPITGQIRCSSNITGLLLTRDGGNSTETETEIFRPGG
GDMRDNRSELYKYKVVRIEPIGVAPTRAKRRTVQREKRAVGIGAVFLGFLGAAGS
TMGAASVTLTVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQNMLRLTVWGIKQLQARVLALE
RYLRDQQLMGIWGCSSGKLICTTSPWNVSWSNKSVDIWNMTWMEWEREIDNYT
DYIYDLLEKSQTQEQEKNEKELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIR

Figura 16J

gp160_{HIVΔ} V1V2

atgagagtgaaggagaaatcatcagcacttgggagatgggggtggagatggggcaccatgctccttgggatgttgatgatctgtagtgc
 tacagaaaaattgtgggtcacagtctattatggggtaccctgtgtggagagaagcaaccaccactctatfttgtgcatcagatgctaaagcc
 tatgalacagagggtacataatgfttgggcccacacalgcctgtgtacccacagaccccacccacaagaagtaglattgggaaatgtgac
 agaaaatttaacatgtggaaaaataacalggtagatcagatgcatgaggatataatcagttatgggatgaaagcctaaagccatgtgta
 aaaltaaccccactctgtgtactttaaatlgtaacacctcagtcattacacaggcctgtccaaaggtalcctttcagccaattccacatacatt
 altgtgtccggctgggtttgcgatactaaagtgtacaataagacattcaatggatcaggaccatgcacaaatgtcagcacagtacaat
 gtacacatggaattaggccagtggtgtcaactcaactgctgttaaatggcagcttagcagaagagacatagtaattagatctgaagatt
 cacagacaatgtttaaaccataatagtlacagctaaatgaactgttagtaattaattgtacaagacccaacaacaatacaagagaaaggfta
 tctataggaccaggagagcattttatgcaagaagaacataataggagatalaagacaagcacaltglaacattagtagagcaaatg
 gaalaacactttacaacagatagttataaaatgaagagaaaaatttaggaataaaacaatagcctttaatcaatccicaggaggggacca
 gaaattgtaatgcacagtttaattgtggaggggaaatttttctactgtaatacagcacaactgtttaatagtacttggaaatgttctggaggga
 caaatggcactgaaggaaatgacataalcacacliccaatgcagaataaaacaaattataaatatgtggcagaaagtaggaaaagcaat
 gtalgccctcccacagggacaaatagatgttcatcaaataftacagggtgctactaacaagagatggaggttaatgactgagac
 tgagactgagatctcagacctggaggaggagatagagggacaaatggagaagtgaattatataaatataaaagtagtaagaattgaac
 caataggagtagcaccaccaggggcaaaagagaagaacagtgcaaaagagaaaaagagcagtggggaataggagctgtgtccttgg
 gftcttgggagcagcaggaaagcactatgggcgcagcgtcagtgacgctgacggtacagggcaggctatttltgtctggtatagtgcag
 cagcagaacaatctgctgagggtattgagggcgaacagaatattgtgcactcacagctcggggcatcaagcagctccaggcaaga
 giccttggctctggaaagatacctaagggatcaacagctcatgggaattgggggtgctclggaaaactcatttgcaccacttctgtgcctt
 ggaatgtagttggagtaataaatctgtggatgatattggaataacatgacctggatggagtgggaaagagaaattgacaattacacag
 actatataatgacttacttgaaaaatcgaacccaacaagaaaagaatgaaaaagaattattggaattggataaatgggcaagtttgtg
 gaattggttgacataacaactggctgtggtatataagattatcataatgalagtaggaggcttgataggttaagaatagttttgcigtg
 cttctatagtaaalagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagacctcctcccagcctcgaggggaccggacaggcccgaa
 ggaacagaagaagaagglggagagagagacagagacagatccgggtccatcagtgaaaggatccttggcacttactgggacgatct
 gcggagcctgtgcctctcagctaccaccgcttgagagacitactcttgattgtaacgaggattgtggaacttctgggacgcagggggtg
 ggaagccctcaaatattggtggaatcicctacagtattggagtcaggaactaaagaatagtgctgttagcttctacaatatgggtggag
 ctattccatgaggcgtccaggccgtctggagatctgcgacagagactcttgcgggcgcgtggggagactttagggagactcttagg
 agagggtgaagatggatactcgaalccccaggaggattagacaagggttgagctcactctcttga

Figura 16K

MRVKEKYQHLWRWGWRWGTMLLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWREATTLF
CASDAKAYDTEVHNVWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTENFNMWKNMVDQMHE
DIISLWDESLKPCVKLTPLCVTLNCNTSVITQACPKVSFQPIPIHYCVPAGFAILKCNNK
TFNGSGPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEEDIVIRSEDFTDNVKTIIVQLNES
VVINCTRPNNNTRERLSIGPGRIFYARRNIIGDIRQAHCNISRAKWNNTLQQIVIKLRE
KFRNKTIAFNQSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFYCNTAQLFNSTWNVAGGTNGTEGNDII
TLQCRIKQIINMWQKVGKAMYAPPITGQIRCSSNITGLLLTRDGGNSTETETEIFRPGG
GDMRDNRSELYKYKVVRIPIGVAPTRAKRRTVQREKRAVGIGAVFLGFLGAAGS
TMGAASVTLTVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQNMLRLTVWGIKQLQARVLALE
RYLRDQQLMGIWGCSSGKLICTTSVPWNVSWSNKSVDIWNMMTWMEWEREIDNYT
DYIYDLLEKSQTQOEKNEKELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIRLFIMIVGGLIGLRI
VFAVLSIVNRVRQGYSPLSFQTLLPASRGPDRPEGTEEEGGERDRDRSGPSVNGSLALI
WDDLRSCLFSYHRLRDLLIVTRIVELLGRRGWEALKYWWNLLQYWSQELKNSAV
SLLQYGWSYFHEAVQAVWRSATETLAGAWGDLWETLRRGGRWILAIARRIRQGLEL
TLL

Figura 16L

gp140_{HIV}ΔV1V2V3

atgagagtgaaggagaaatcagcacttggagatgggggtggagatggggcaccatgctcctggggaigtgatgatctgtagtgc
 tacagaaaaattggggc acagictattatggggtagctgtggagagaagcaaccaccactctatgttggcaltcagatgctaaagcc
 tatgatacagaggtagataatgttgggccacacatgctgtgtlaccacagacccaaccacaagaagtagtattgggaaatgtgac
 agaaaaittaacatgtggaaaaaacaaggtagatcagatgcatgaggatalaatcagttatgggatgaaagccaaagccatgtgta
 aaattaaccccactctgtgttactttaaattgaacacctcagtcattacacaggcctgtccaagggtatcctttcagccaatcccatacatt
 attgtgtcccggctgggttgcgatactaaagtgaacaalagacattcaatggatcaggaccatgcacaaalgtcagcacagtacaal
 glacacatggaattaggccagtgggtgcaactcaactgclgttaaalgagcttagcagaagaagacatagtaattagatcigaagattt
 cacagacaalgttaaaccataatgtacagctaaatgaatctgtagtaattaattgtacaagaccaacaacaatgctgcagaattggat
 aatgggcaagtgtgcaagacaagcacattgaacallagtagagcaaaalggaataacactttacaacagatagttataaaatlaaga
 gaaaaatttaggaataaaacaatagcctttaatcaalcctcaggaggggaccagaaatgtaatgcacagtttaattgtggagggggaat
 ttttctactgtaatacagcacaactgtttaaatagtacttggaaatgttctggagggacaaatggcactgaaggaaatgacataatcacactc
 caatgcagaataaaacaattataaataatgtggcagaagtaggaaaagcaatgtatgccccicccatcacaggacaaaltagalgttca
 tcaaatattacagggctgctactaacaagagatggaggtaatagtagactgagactgagactgagatcttcagacctggaggaggagatat
 gagggacaaltggagaagtgaattatataatataaagtagtaagaatgaaccaataggagtagcaccaccaggggcaagagaag
 aacagtgcaagagaaaaaagagcagtgggaataggagctgtgttccctgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggctgag
 cgtcagtgacgctgacggtagcaggccaggctattattgctggatagtgacgagcagaacaatcgtctgaggggctattgaggcgc
 cagaatattgtgcgactcacagctggggcatcaagcagciccaggcaagagtcctggctctggaaaatacctaagggatcaacagc
 tcatgggaattggggtgctctggaaaactcattgcaccacttctgtgccttggaaatgtagttggagtaataaatctgtggatgatattg
 gaataacatgacciggaatggatggagtggaagagaaattgacaattacacagactatatatagacttacttgaaaaatcgcacccaaca
 agaaaaaatgaaaaaagaattattggaatggataaatgggcaagtttgggaattggttgacataacaactggctgtggtatataaga
 taal

Figura 16M

MRVKEKYQHLWRWGWRWGTMLLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWREATTLF
CASDAKAYDTEVHNVWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTENFNMWKNNMVDQMHE
DIISLWDESLKPCVKLTPLCVTLNCNTSVITQACPKVSFQPIPIHYCVPAGFAILKCNNK
TFNGSGPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGLAEEDIVIRSEDFTDNVKTITVQLNES
VVINCTRPNNNAEELDKWASAAARQAHCNISRAKWNNTLQQIVIKLREKFRNKTIAFN
QSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFYCNTAQLFNSTWNVAGGTNGTEGNDIITLQCRIKQII
NMWQKVGKAMYAPPITGQIRCSSNITGLLLTRDGGNSTETETEIFRPGGGDMRDNR
SELYKYKVVRIPIGVAPTRAKRRTVQREKRAVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASVTL
TVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQNMLRLTVWGIKQLQARVLALERYLRDQQLM
GIWGCSGKLICTTSPWNVSWSNKSVDIWNMTWMEWEREIDNYTDYIYDLLEKS
QTQQEKNEKELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIR

Figura 16N

gp160_{HIV}ΔV1V2V3

atgagagtgaaggagaaatatacagcacttgtggagatgggggtggagatggggcaccatgctcctgggatgttgatgatctgtatgtg
 tacagaaaaattgtgggtcacagtctattatgggtacctgtgtggagagaagcaaccaccactctatttggcaltcagatgctaaagcc
 tatgatacagaggtacataatgttgggcccacacatgcctgtgtacccacagacccaaccacaagaagtagtattgggaaatgtgac
 agaaaatttaacatgtggaaaaataacatggtagatcagatgcatgaggatataalcagtttatgggatgaaagcctaaaagccatgtgta
 aaattaaccccactctgtgttactttaaattgtaacacctcagtcattacacaggcctgtccaaaggtalccttcagccaattcccatacatt
 attgtgtcccggctgggttgcgatactaaagtgaacaataagacattcaatggatcaggaccatgcacaaatgtagcacagtaacaat
 gtacacatggaattaggccagtggtgtcaactcaactgctgttaaatggcagcttagcagaagaagacatagtaattagatctgaagatt
 cacagacaatgttaaaaccataatgtacagctaaatgaatctgtagtaattaatgtacaagacccaacaacaatgctgcagaattggat
 aaatgggcaggtgctgcaagacaagcacattgtaacattagtagagcaaaaatggaalaacacittacaacagatagttataaaattaaga
 gaaaaatttaggaataaaacaatagccttaatacctcagggagggagcccaaaaattgtaatgcacagtttaattgtggaggggaa
 ttttctactgtaatacagcacaactgttaalagtacttggaaatgtgctggagggacaaaaggcactgaaggaaatgacataatcacactc
 caatgcaagaataaaacaaattataaataatgtggcagaagtaggaaaagcaatgtatgccccccatcacaggacaaatlagatgttca
 tcaaatattacagggctgctactaacaagagatggaggtaalagtactgagactgagactgagatcttcagacctggaggaggagat
 gagggacaalggagaagtgaattatataaataaaagtagtaagaattgaaccaataggagtagcaccaccagggc aaagagaag
 aacagtgcaaaagagaaaaagagcagtggaataggagctgtgttccttgggtcttgggagcagcaggaagcactatgggcgcag
 cgtcagtgacgctgacgggtacagggcaggctattatgtctggtatagtcagcagcagaacaatctgctgagggctattgaggcgca
 cagaatatgttgcgactcacagctcgggcatcaagcagctccaggcaagagtcctggcctggaaagatacctaagggatcaacagc
 lcatgggaatttggggtgctctgaaaactcatttgcaccactctgtgccttggaaatgtagtgaggtaataaaatctgtggatgatattg
 gaalaacatgacctggatggagtggaagagaaatgacaattacacagactatataatgacttacttgaaaaatgc aaacccaaca
 agaaaagaatgaaaaagaattattggaattggataaaatggcaagtttgggaattggttgacataacaactggctgtggtatataaga
 ttattcataatgatagtaggaggctgataggittaagaalagttttgctgtactttctatagtaaataagagttaggcagggatattcaccatt
 atcgtttcagaccctcctccagccctgaggggacccgacaggcccgaaggaaacagaagaagaa ggtggagagagagacagaga
 cagatccggctcatcagtgaaacggatccttggcacttatctgggacgatctgcggaacctgtgcctcttcagctaccaccgcttgagag
 acttactctgattgtaacgaggattgtgaactctgggacgcaggggggtgggaagcccaaatattggtggaatctctacagtattg
 ggtcaggaactaaaagaatagtgctgttagcttgcataaatgggtggagclatttccatgaggcgggtccaggccgtctggagatctgc
 gacagagactcttgcgggcgcgtggggagacttatgggagactcttaggagaggtggaagatggatactcgaatcccaggagga
 ltagacaagggcttgagctcactctctgtga

Figura 160

MRVKEKYQHLWRWGWRWGTMLLGMLMICSATEKLWVTVYYGVPVWREATTTLF
 CASDAKAYDTEVHNWATHACVPTDPNPQEVVLGNVTENFNMWKNMVDQMHE
 DIISLWDESLKPCVKLTPLCVTLNCNTSVITQACPKVSFQPIPIHYCVAGFAILKCNNK
 TFNGSGPCTNVSTVQCTHGIRPVVSTQLLNGLAEEDIVIRSEDFTDNVKTIIVQLNES
 VVINCTRPNNNAELDKWASAAARQAHCNISRAKWNNTLQQIVIKLREKFRNKTIAFN
 QSSGGDPEIVMHSFNCGGEFFYCNTAQLFNSTWNVAGGTNGTEGNDIITLQCRIKQII
 NMWQKVGKAMYAPPITGQIRCSSNITGLLLTRDGGNSTETETEIFRPGGGDMRDNWR
 SELYKYKVVRIEPIGVAPTRAKRRTVQREKRAVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASVTL
 TVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQNMLRLTVWGIKQLQARVLALERYLRDQQLM
 GIWGCSGKLICTTSVPWNVSWSNKSVDIWNMTWMEWEREIDNYTDYIYDLLEKS
 QTQQEKNEKELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIRLFIMIVGGLIGLRIVFAVLSTVNR
 VRQGYSPFSQTLTPASRGPDREGEETEEGGERDRDRSGPSVNGSLALIWDDLRSCL
 FSYHRLRDLIVTRIVELLGRRGWEALKYWWNLLQYWSQELKNSAVSLLQYGWSY
 FHEAVQAVWRSATETLAGAWGDLWETLRRGGRWILAIIPRRIRQGLELTL

Figura 16P

Gag_{HIV} (p17-p24Δmyr)

Atgggcgcccgcgccagcgtgctgagcggcggcagctggaccgctgggagaagatccgctgcgccccggcggcaagaaga
 agtacaagctgaagcacatcgtgtggccagccgcgagctggagcgttcgccgtgaaccccggcctgctggagaccagcgaggg
 ctgccccagatcctgggcccagctgcagcccagcctgcagaccggcagcgaggagctgcgcagcctgtacaacaccgtggccacc
 ctgtactgcgtgcaccagcgcacgcaggtgaaggacaccaaggaggccclggagaagatcaggaggagcagaacaaggcaag
 aagaaggcccagcaggccgccgccgacaccggcaacagcagccaagtgagccagaactaccccatcgtgcagaacctgcaggg
 ccagatggtgcaccaggccatcagccccgcaccctgaacgcctgggtgaagggtggtggaggagaaggccttcagccccgaggtg
 atccccatgtcagcggcctgagcgaggggcggcacccccaggacctgaacaccatgctgaacaccgtgggcggccaccaggccg
 ccatgcagatgctgaaggagaccatcaacgagggaggccgccgagtgggaccgctgcaccccgctgcacggcggccccatcgccc
 ccggccagatgcgcgagccccgcggcagcgacatcgccggcaccacgagcacctgcaggagcagatcggtggatgaccaac
 aacccccctatccccgtgggcgagatctacaagcgctggatcctcctgggctgaacaagatcgtgcgcatgtacagccccacgagc
 atcctggacatccgccagggcccccaaggagccctccgcgactacgtggaccgcttctacaagaccctgcgggcccagcaggcca
 ccaggagggtgaagaactggatgaccgagaccctgctggtgcagaacgccaaccccgactgcaagaccatcctgaaggccctgggc
 cccgccccaccctggaggagatgatgaccgctgccagggcgtgggcggccccggccacaaggccccgctgctgtaa

Figura 16Q

MGARASVLSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLVHIVWASRELERFAVNPGLLETSEG
CRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEVKDTKEALEKIEEEQNKSKKK
AQQAAADTGNSSQVSQNYPIVQNLQGGQMVHQAI SPRTLNAWVKVVEEKAFSPEVIP
MFSALSEGATPQDLNMLNTVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRLHPVHAGPIAPG
QMRPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTNPPVGEFYKRWIILGLNKIVRMYSPSILDIR
QGPKEFRDYVDRFYKTLRAEQASQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTILKALGPAAT
LEEMMTACQGVGGPGHKARVL

Figura 16R

Tat_{HIV}

Atggagccagtagatcctagactagagccctggaagcatccagggagtaagcctaaaactgcttgtaccaattgctattgtaaaaagtg
ttgctttcatlgccaagtttgttcacaacaaaagccttaggcctctctatggcaggaagaagcggagacagcgacgaagagctcatca
gaacagtcagactcatcaagcttctctatcaagcagccctctcccagcctcgaggggacccgacaggcccgaaggaacagaaga
agaaggtggagagagagacagagacagatccggtccatcagtga

Figura 16S

MEPVDPRLPWKHPGSKPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFTTKALGISYGRKKRRQRR
RAHQNSQTHQASLSKQPSSQPRGDPTGPKEQKKKVERETETDPVHQ

Figura 16T