

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 915**

51 Int. Cl.:

A61K 39/21 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/863 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2009 PCT/FR2009/051704**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.03.2010 WO10029260**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2009 E 09741397 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2337581**

54 Título: **Construcción de un gen sintético que codifica el gag del VIH1 y su utilización para la obtención de vacunas contra el VIH-1**

30 Prioridad:

10.09.2008 EP 08290849

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

14.11.2017

73 Titular/es:

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (33.3%)

101 Rue de Tolbiac

75013 Paris, FR;

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (33.3%) y

UNIVERSITÉ PARIS-EST CRÉTEIL VAL DE MARNE (33.3%)

72 Inventor/es:

GUILLET, JEAN-GÉRARD;

LEVY, YVES;

BALLOUL, JEAN MARC y

SCHMITT, DORIS

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 641 915 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

Construcción de un gen sintético que codifica el gag del VIH1 y su utilización para la obtención de vacunas contra el VIH-1

5

[0001] La presente solicitud describe un gen sintético que codifica la proteína Gag (p55) de VIH-1 (virus de la inmunodeficiencia humana) y su utilización para la obtención de vacunas contra el VIH.

[0002] Las vacunas contra el VIH actualmente en curso de desarrollo se basan en diferentes enfoques (para revisión cf. por ejemplo (NABEL, Nature, 410, 1002-7, 2001) entre los que se citará la utilización de vectores de expresión, especialmente unos vectores virales recombinantes, en los que se insertan unas porciones del genoma de VIH que codifica unos polipéptidos que llevan unos epitopos reconocidos por unos anticuerpos o por unos linfocitos T citotóxicos (CTLs), anti-VIH y, por tanto, potencialmente inductores de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular anti-VIH.

15

[0003] Entre las regiones del genoma de VIH más utilizadas en este marco, figuran las derivadas del gen *gag*. La proteína Gag constituye especialmente un inmunógeno particularmente interesante para la inducción, no solo de una respuesta anticuerpo, sino igualmente de una respuesta CTL.

[0004] Generalmente, a fin de inducir la respuesta inmunitaria más amplia posible, se asocian en un mismo vector diferentes porciones del genoma de VIH, cuya expresión a partir de este vector se efectúa en forma de una proteína de fusión. Se citarán a título de ejemplos, unas proteínas de fusión que asocian la proteína Gag con unas regiones de la proteína Pol, de la proteína Nef y/o la proteína Env.

[0005] Un problema encontrado durante la utilización de estos vectores de expresión reside en el reducido nivel de expresión de los genes de VIH que se insertan y en la falta de estabilidad de esta expresión.

[0006] Un enfoque actualmente utilizado para aumentar el nivel de expresión de los genes de VIH consiste en optimizar su secuencia codificadora, para suprimir las secuencias nucleotídicas inhibitoras (INS) ricas en AT, presentes especialmente en los genes *gag*, *pol* y *env* y para modificar el uso de los codones, reemplazando ciertos de los codones iniciales de VIH por unos codones sinónimos preferencialmente utilizados en las células humanas (QIU et al., J Virol, 73, 9145-52, 1999; Zur Megede et al., J Virol, 74, 2628-35, 2000; Kotsopoulou et al., J Virol, 74, 4839-52, 2000).

[0007] Este enfoque permite aumentar el nivel de expresión, pero la estabilidad de esta expresión sigue siendo aún problemática, especialmente en el caso del gen *gag*.

[0008] Los inventores han emitido la hipótesis de que la presencia de numerosos motivos poly C, poly G o poly GC en las secuencias utilizadas para expresar la proteína *gag* desempeñaba una función en esta falta de estabilidad y han procedido a una optimización suplementaria en vista de suprimir los motivos poly C o poly G de tamaño superiores a 3 nucleótidos y los motivos poly GC de tamaño superior a 8 nucleótidos.

[0009] La presente invención se define por las reivindicaciones.

[0010] La presente solicitud describe en consecuencia un polinucleótido que codifica la proteína Gag (p55) de VIH-1, caracterizado porque se define por la secuencia SEQ ID NO: 1.

[0011] La presente solicitud describe igualmente un polinucleótido recombinante, que comprende la secuencia SEQ ID NO:1. Ventajosamente, dicho polinucleótido recombinante codifica una proteína de fusión que comprende la proteína Gag (p55) de VIH-1, fusionada con uno varios polipéptido(s) diferente(s) de VIH.

[0012] De preferencia, el(los) denominado(s) polipéptido(s) diferente(s) de VIH se escoge(n) entre la proteína Pol, la proteína Nef, la proteína Env o cualquier fragmento de dichas proteínas que lleva al menos un epitopo reconocido por unos anticuerpos anti-VIH o por unos linfocitos T citotóxicos CTLs anti-VIH. A título de ejemplos no limitativos de tales fragmentos, se citarán unos fragmentos de la proteína Pol homólogos a los fragmentos 172-219, 325-383 y 461-519 de la proteína Pol del aislamiento VIH-1 Bru/LAI y los fragmentos de la proteína Nef homólogos a los fragmentos 66-147 y 182-206 de la proteína Nef del aislamiento VIH-1 Bru/LAI. El aislamiento VIH-1 Bru/LAI se clasifica en el catálogo Los Alamos con el número de acceso K02013. Salvo que se indique lo contrario, la numeración de los aminoácidos de las secuencias de las proteínas de este aislamiento se utiliza aquí como

referencia, cuando unos fragmentos peptídicos se definen por su localización con respecto a la secuencia de una proteína de VIH.

[0013] Según un modo de realización preferido descrito en la presente solicitud, dicho polinucleótido 5 recombinante se define por la secuencia SEQ ID NO: 2.

[0014] Codifica la proteína de fusión gag-nef-pol, definida por la secuencia SEQ ID NO: 3.

[0015] Esta proteína de fusión, que se describe igualmente en la presente solicitud, comprende, además de 10 la totalidad de la proteína Gag (p55) (aminoácidos 1-512 de la secuencia SEQ ID NO: 3), unos fragmentos correspondientes a los fragmentos 461-519, 325-383 y 172-219 de la proteína Pol del aislamiento VIH-1 Bru/LAI (estos fragmentos son representados respectivamente por los aminoácidos 517-575, 605-663 y 748-795 de la secuencia SEQ ID NO: 3) y unos fragmentos correspondientes a los fragmentos 182-206 y 66-147 de la proteína Nef del aislamiento VIH-1 Bru/LAI (estos fragmentos son representados respectivamente por los aminoácidos 577-601 y 15 665-746 de la secuencia SEQ ID NO: 3).

[0016] La presente solicitud describe igualmente un vector recombinante que contiene un polinucleótido descrito en la solicitud.

20 **[0017]** De preferencia, un vector recombinante tal como se describe en la solicitud es un vector de expresión; ventajosamente se trata de un vector de vacunación.

[0018] Muchos vectores de vacunación, utilizables especialmente en el marco de la vacunación contra el VIH, son conocidos en sí mismos. A títulos de ejemplos, se citarán los vectores con ADN desnudo, así como los vectores 25 virales recombinantes. Entre estos últimos, se mencionarán especialmente: los vectores derivados de poxvirus, por ejemplo del virus de la vacuna, tales como el NYVAC (vacuna New-York) y el MVA (virus Ankara modificado) o poxvirus aviares tales como el canarypox; los vectores derivados de adenovirus, tales como el adenovirus de tipo 5 (Ad5); unos vectores derivados de alfavirus, de myxomavirus o de virus herpes defectivos.

30 **[0019]** Según un modo de realización preferido descrito en la presente solicitud, dicho vector se deriva de un virus de la vacuna y, ventajosamente, del virus MVA. Este virus, que deriva de la cepa Ankara del virus de la vacuna, se ha atenuado fuertemente por 574 pasos sobre unos fibroblastos embrionarios de pollo, a continuación de los que ha perdido la capacidad de reproducirse eficazmente en la mayoría de las células de mamíferos (solo se observa una replicación eficaz en los fibroblastos embrionarios de pollo y las células BHK-21). Esta atenuación resulta de 35 varias escisiones (escisiones I, II, III, IV y VI) en el genoma viral (MEYER et al., J Gen Virol, 72 (Pt 5), 1031-8, 1991). Se puede insertar material genético exógeno al nivel de cualquiera de estas escisiones.

[0020] La presente invención tiene igualmente como objeto la utilización de un vector recombinante conforme a la invención, para la obtención de una vacuna contra el VIH. 40

[0021] La invención se refiere igualmente a una composición inmunógena o de vacunación que comprende un vector recombinante según la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Unos vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por el experto en la materia. Se puede hacer referencia especialmente a la obra Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21e edición, Lippincott Williams & 45 Wilkins. En este marco, dicho vector se puede utilizar ventajosamente en asociación con los lipopéptidos, por ejemplo unos lipopéptidos palmitoil. Los lipopéptidos están constituidos por fragmentos inmunógenos de proteínas de VIH vinculados de forma covalente a una cadena lipídica. Unos lipopéptidos utilizables en el marco de la presente invención se describen por ejemplo en las Solicitudes EP0491628 o WO 99/51630. Ventajosamente, los fragmentos inmunógenos de proteínas del VIH utilizados son unos fragmentos homólogos a los fragmentos 17-35 y 253-284 de 50 la proteína Gag, al fragmento 325-355 de la proteína Pol y a los fragmentos 66-97 y 116-145 de la proteína Nef.

[0022] Ventajosamente, los vectores recombinantes conformes a la invención se pueden utilizar en asociación con unos lipopéptidos en el marco de una vacunación de tipo «prime-boost», (que comprende una primo-inmunización con un vector conforme a la invención, seguida de un refuerzo con dichos lipopéptidos o, a la inversa, 55 una primo-inmunización con los lipopéptidos, seguida de un refuerzo con un vector conforme a la invención).

[0023] Según otro aspecto, la solicitud describe un método para inducir una respuesta inmune en el caso de un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicho método la administración de un vector recombinante descrito en la solicitud.

[0024] La solicitud describe igualmente un método de prevención o tratamiento de una infección por VIH que comprende la administración a un sujeto que lo necesita de un vector recombinante descrito en la solicitud. En particular, la infección puede ser una infección por VIH-1. El vector recombinante se administra preferencialmente en una cantidad inmunológicamente eficaz, es decir una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunológica protectora o terapéutica en el caso del sujeto que haya recibido el vector o la composición inmunógena o de vacunación que lo comprende.

[0025] La presente invención se ilustra, de manera no limitativa, por las figuras y los ejemplos siguientes.

La figura 1 esquematiza el vector de transferencia pTG16626. BRD3: brazo de recombinación derecho (secuencia situada más abajo de la escisión III del MVA); BRG3: brazo de recombinación izquierdo (secuencia situada más arriba de la deleción III del MVA); GPT/EGFP: marcador de selección; BRG3': secuencia de repetición de BRG3.

La figura 2 esquematiza el vector pTG17401, resultante de la inserción de la construcción *gag(degenerado)-pol-nef* en pTG16626.

La figura 3 representa la secuencia de la región del vector pTG17401 que comprende la secuencia BRG3', la cinta de selección que contiene el gen de fusión EGFP/GPT bajo control del promotor p11K7.5K, la secuencia BRG3, el gen de fusión *gag(degenerado)-pol-nef* bajo control del promotor ph5R y la secuencia BRD3.

La figura 4 representa los resultados del análisis por Western Blot de la expresión de *gag(degenerado)polnef* en unas células embrionarias de pollo: CEP: control (células no infectadas); MVATGN33: células infectadas por MVATGN33; MVATG17401 PMVS1: células infectadas con el stock primario PMVS1 de MVATG17401; MVATG17401 purificado: células infectadas con el virus MVATG17401 purificado.

La figura 5 representa la filiación entre los diferentes lotes de virus después de la sub-clonación y amplificación del virus MVATG17401.

EJEMPLO 1: OBTENCIÓN DE UNA SECUENCIA GAG DEGENERADA Y UNA CONSTRUCCIÓN GAG(DEGENERADA)-POL-NEF QUE CONTIENE ESTA SECUENCIA.

[0026] La secuencia degenerada de *gag* (SEQ ID NO: 1) se ha fraccionado en dos partes, que se han ensamblado individualmente por PCR a partir de oligonucleótidos sintéticos. Este conjunto ha generado dos fragmentos, formando *BamHI-EcoRV* (fragmento 1) y *EcoRV-SalI* (fragmento 2), los sitios *EcoRV* y *SalI* parte integrante de la secuencia de *gag* modificada.

[0027] Los dos fragmentos *BamHI-EcoRV* y *EcoRV-SalI* obtenidos así, así como un fragmento *SalI-NotI* de 851 pb, que contienen unas secuencias que codifican unos fragmentos de proteínas Pol y Nef están vinculados entre sí por la ligasa T4 y el fragmento *gag(degenerado)-pol-nef* resultante se clona entre los sitios *BamHI* y *NotI* del vector de transferencia pTG16626, descrito a continuación y esquematizado en la figura 1.

[0028] El vector de transferencia pTG16626 contiene una cinta de expresión constituida por un enlazador multisitio que permite la inserción de una secuencia exógena bajo control transcripcional del promotor ph5R (promotor tardío/precoz del virus de la vacuna, SMITH et al., Vacuna.; 11, 43-53, 1993). Esta cinta está enmarcada por los brazos de recombinación BRD3 y BRG3, que corresponden a las secuencias que flanquean la zona de escisión III del virus MVA y permitirán la inserción de la cinta en el genoma del MVA al nivel de esta zona de escisión. Este vector contiene además una cinta de selección, basada en la expresión del gen de fusión EGFP/GPT (enhanced green fluorescent protein/xanthine-guanine phosphoribosyl transferase de E. Coli) colocado bajo control del promotor de vacunación p11K75 (promotor precoz-tardío sintético, que resulta de la fusión del promotor tardío p11K y del promotor precoz p7.5K, descrito por ejemplo en la solicitud EP1146125). La síntesis de xantina guanina fosforibosil transferasa permite la formación de rangos virales de MVA recombinante en medio selectivo que contiene xantina, ácido micofenólico e hipoxantina (FALKNER and MOSS, J Virol, 62, 1849-54, 1988) y la síntesis de EGFP permite la visualización de rangos fluorescentes. Esta cinta de selección está enmarcada por una parte por la secuencia BRG3 y, por otra parte, por una secuencia homóloga BRG3'. La recombinación de supresión endógena entre estas dos secuencias homólogas permite la eliminación de la cinta de selección después de varios pasos del MVA recombinante en medio no selectivo.

[0029] La inserción del fragmento *gag(degenerado)pol-nef* en el vector pTG16626 abierto por *BamHI NotI* genera el vector pTG17401, que se esquematiza en la figura 2.

[0030] La secuencia de la región del vector pTG17401, que comprende la secuencia BRG3', la cinta de selección que contiene el gen de fusión EGFP/GPT bajo control del promotor p11K7.5K, la secuencia BRG3, el gen

de fusión *gag(degenerado)-pol-nef* bajo control del promotor ph5R y la secuencia BRD3, se representa en la figura 3 (SEQ ID NO: 4).

5 EJEMPLO 2: GENERACIÓN DE UN VIRUS DE LA VACUNA RECOMBINANTE QUE EXPRESA EL GEN DE FUSIÓN GAG(DEGENERADO)-POL-NEF

10 **[0031]** La generación de virus de la vacuna recombinante se realiza por recombinación homóloga entre el plásmido de transferencia pTG17401 y un virus MVA (MVATGN33). Los virus recombinantes se seleccionan por su capacidad para formar unos rangos de lisis en presencia de ácido micofenólico.

15 **[0032]** Las células embrionarias de pollo utilizadas para la generación de recombinantes se han obtenido por tratamiento de embriones de pollo durante 2H a 37 °C con la solución TrypLE™ Select (Gibco) a razón de 200 ml para 10 embriones. Estas células se cultivan a continuación en medio MBE (Eagle Based Medium, Gibco) añadiéndole un 5% de SVF, gentamicina 40µg/L a 37 °C 5%CO₂.

20 **[0033]** Unas cajas Falcon 3001 se cultivan con 1,5.10⁶ CEPs /caja en el medio MBE añadiendo un 10% de SVF. Después de 48h de incubación a 37 °C 5%CO₂, las células se infectan con MVATGN33 a razón de 0,02 úfp/célula, diluido en PBS + cationes (acetato de magnesio 100ug/ml, cloruro de calcio 100mg/L)+ 1% SVF. Después de 30 min, 2ml de MBE + 5%SVF se añaden a las células infectadas. Después se incuban 1h a 37 °C 5% CO₂. El plásmido de transferencia pTG17401 (2 y 5 µg) se precipita en una solución de Hepes y de CaCl₂. El precipitado se deposita sobre las células anteriormente infectadas. Después de 1H a temperatura ambiente, se incuban después de la adición de 2 ml de MBE + 5% SVF, a 37 °C 5% CO₂ durante 2h.

25 **[0034]** Las células se lavan dos veces con PBS + cationes, después incubadas con 2ml de MBE + 5% SVF a 37 °C 5%CO₂. Después de 48h las cajas se congelan.

30 **[0035]** El aislamiento de placas virales se realiza descongelando las cajas anteriores. El contenido de las cajas se recupera en unos tubos Falcon de 6 ml. Después de la sonicación, unas diluciones en serie (10⁻¹ a 10⁻³ para la 1ª selección y 10⁻³ a 10⁻⁶ para las selecciones siguientes) de estos extractos brutos se utilizan para infectar estos CEPs.

35 **[0036]** Una capa de 5 ml de medio MBE de agar al que se añade un 5% SVF de una mezcla de ácido micofenólico (25µg/ml, Sigma), de xantina (250µg/ml, Sigma) e hipoxantina (15µg/ml) se deposita en cada caja para la selección de virus recombinante GPT+. Las cajas se incuban a 37°C 5% CO₂ durante 72H. Una nueva capa de 5ml de medio MBE de agar que contiene un 5% de SVF y una mezcla de ácido micofenólico, de xantina y de hipoxantina y del rojo neutro se deposita sobre la capa de agar anterior. Las cajas se vuelven a incubar a continuación hasta la aparición de unos rangos virales. Los rangos virales fluorescentes aislados se amplifican en CEPs después son analizados por PCR para buscar la presencia del transgén y detectar la contaminación por el virus parental MVATGN33. Los clones seleccionados se amplifican en CEP después se sub-clonan en medio selectivo como se ha descrito más arriba, hasta la completa eliminación del virus salvaje MVATGN33.

40 **[0037]** El marcador de selección EGFP/GPT ha sido eliminado a continuación por varios pasos en el medio no selectivo. Esta eliminación se obtiene por recombinación de supresión endógena entre las secuencias homólogas que enmarcan la cinta de selección.

45 **[0038]** Después de la verificación de la presencia del gen *gag(degenerado) pol-nef*, de la ausencia del gen EGFP/GPT y de la ausencia de contaminación por el virus salvaje MVATGN33, un clon, denominado a continuación MVATG17401 se ha seleccionado para generar el stock primario de virus recombinantes (denominado PMVS1). Este stock está constituido del siguiente modo: 100µl de amplificación del clon seleccionado se utilizan para infectar 50 2 flasks F175 que contienen unos CEPs (50ml a DO_{560nm}=0,23-0,24/ F175) cultivadas 48h. Cada flask contiene 25 ml de medio MBE + 5% SVF. Se incuban durante 72h a 37°C 5%CO₂ después de congelan. Después de la descongelación y sonicación, este stock se analiza en CEP y se utiliza como semilla para la producción de virus purificado.

55 **[0039]** Para la producción del virus recombinante purificado, unos flasks F500 cultivados con unos CEPs cultivados en VP-SFM se infectan con el stock primario a razón de 0,02 úfp/célula en el medio MBE sin suero durante 72h a 37°C 5%CO₂. Las células infectadas se recolectan después de la centrifugación, después se congelan. Los sobrenadantes de centrifugación se conservan a 4 °C. El virus se purifica a continuación en dos almohadillas consecutivas de sacarosa 36% seguido de un gradiente de sacarosa (30% a 45%). Las bandas virales

se extraen y diluyen en la clasificación 10mM pH8 a 1/3. Después de la centrifugación a 4.500 rpm durante 18H, el residuo viral se repite en el tampón después analizado en CEP.

EJEMPLO 3: EXPRESIÓN DE GAG(DEGENERADO)-POL-NEF EN UNOS FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS DE POLLO.

[0040] Unas cajas de amasado Falcon F3001 se cultivan a J-1 con $1,5 \cdot 10^6$ CEPs/caja después infectadas a razón de 0,2 ufp/célula en el medio MBE + 5%SVF e incubadas a 37°C 5%CO₂.

10 **[0041]** Después de 24h, el sobrenadante se elimina y las células se recogen en 300µl de Tampón Clasificación-Glicina 2X (ref: LC2676; Novex) al que se añade un 5% P-mercaptoetanol. El lisado se transfiere en un tubo Eppendorf, sonificado y calentado 5min a 100 °C. El 10% del material se somete a una electroforesis sobre un gel de acrilamida (8%) en unas condiciones desnaturalizantes y reductoras en el Tampón Laemmli.

15 **[0042]** Las proteínas se transfieren a continuación en la membrana PVDF (Macherey Nagel) por electroforesis a 150mA durante 16H en el tampón Clasificación 25mM, glicina 192mM, metanol 20%. Las membranas se saturan en el tampón de saturación PBS 1X, Tween 20 0,5%, SVF 5% durante 2H.

[0043] Las membranas se colocan a continuación durante 2H en presencia del anticuerpo primario (suero policlonal procedente de un grupo de pacientes inmunizados con una mezcla de fragmentos peptídicos de VIH, que contiene unos péptidos homólogos a los fragmentos 66-97, 117-147 y 182-205 de la proteína Nef, a los fragmentos 183-214 y 253-284 de la proteína Gag y al fragmento 303-335 de la proteína Env), diluido a 1/3000^o en el tampón de saturación. Después, las membranas se lavan en el tampón de lavado PBS1X tres veces durante 10min. Las membranas se colocan a continuación en presencia del anticuerpo secundario, anticuerpo anti-IgG humano con biotina (Amersham) diluido a 1/500^o en el tampón de saturación durante 1H. Se lavan como anteriormente. Las membranas se colocan por último durante 30min en presencia de un complejo estreptavidina-peroxidasa con biotina (Amersham) diluido en el tampón de saturación a 1/1000^o. La revelación se realiza con el Kit ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham).

30 **[0044]** Los resultados se ilustran por la figura 4.

[0045] A pesar de la reducida especificidad del suero policlonal humano utilizado, que reconoce una proteína de MVATGN33 que migra casi al mismo nivel que la proteína de fusión Gag-Pol-Nef, estos resultados muestran que la cinta de expresión de *gag(degenerado)pol-nef* contenida en el virus MVATG17401 es funcional. La proteína de fusión expresada a partir de este vector se sitúa aproximadamente a 100 kDa (97kDa teórico), que corresponde al peso molecular esperado para la proteína de fusión Gag-Pol-Nef.

[0046] Una secuenciación del inserto en el virus MVATG17401 que contiene el ORF que codifica la proteína de fusión Gag-Pol-Nef ha mostrado que la proteína de fusión está constituida por 795 aminoácidos y es idéntica a la secuencia teórica esperada.

EJEMPLO 4: ESTABILIDAD GENÉTICA DEL VECTOR RECOMBINANTE MVATG17401 A UNOS NIVELES DE PASO EQUIVALENTES AL LOTE CLÍNICO.

45 **[0047]** La estabilidad genética del vector recombinante MVATG17401 a un nivel de paso equivalente al lote clínico se ha evaluado. Para ello, un lote de calidad BPF, directamente derivado del lote de semilla primaria (LSP), ha sido analizado por PCR, Western blot y secuenciación. Más de 100 placas individuales aisladas a partir del mismo material han sido analizadas por Western blot para verificar la estabilidad genética del vector recombinante MVATG17401.

50

Materiales y métodos

Material BPF

55 **[0048]** La expresión de la proteína de fusión ha sido analizada por Western blot para el LS (lote Y501), el material a granel del lote toxicológico antes del llenado (X511E03) y del lote clínico (Z568). La filiación de los lotes se muestra en la figura 5. El análisis PCR y la secuenciación se han efectuado en el Adn aislado del lote de toxicología después del llenado (Y511). El análisis de la expresión de la proteína de fusión por Western blot se ha aplicado también en unos clones individuales aislados del material a granel del lote toxicológico (X511E03).

Caracterización del inserto genético por PCR

5 **[0049]** Dos pares de cebos se han utilizado para cubrir la totalidad de la cinta de expresión y las secuencias virales de flaqueo. El tamaño de los fragmentos amplificados es de 1682 pb (fragmento PCR A, cebo sentido: CATGACGAGCTTCCGAGTTC (SEQ ID NO :5), cebo antisentido: GTTGAAGCACTTCACCATCTTCCTCTG (SEQ ID NO :6)) y 1833 pb (fragmento PCR B, cebo sentido: CCTGAACAAGATCGTGAGGATG (SEQ ID NO :7), cebo antisentido: GCTCCTTATACCAAGCACTC (SEQ ID NO :8)).

10 *Western blot*

[0050] Unas células A549 infectadas se han lisado con el tampón LDS en presencia de β -mercaptoetanol. Las proteínas se han separado por electroforesis sobre gel de poliacrilamida 10% y transferidas sobre una membrana PVDF. La poliproteína se ha detectado con un anticuerpo monoclonal murino dirigido contra la proteína 15 Gag del VIH-1 (anti-VIH-1-p24). Unos anticuerpos de cabra anticuerpos murinos vinculados a la biotina y un complejo estreptavidina-peroxidasa se han utilizado para el marcado.

Sub-clonación y determinación de la proporción de clones que expresan la proteína de fusión

20 **[0051]** Unas placas del vector MVATG17401 se han aislado a partir de capas de células BHK infectadas con el material a granel del lote toxicológico (X511E03) y recubiertas de agarosa. Un total de 113 placas se ha aislado y amplificado en dos ciclos sucesivos en unas placas 96 pozos. Una placa supuestamente contaminada se ha separado de la continuación del análisis. Las otras placas se han utilizado para infectar unas células A549 de manera que se exprese la proteína de fusión.

25

Especificidad de los anticuerpos monoclonales utilizados para la inmunodetección

[0052] El anticuerpo monoclonal murino anti-VIH-1-p24 (1A) proviene de Perkin Elmer (ref NEA-9306). Se ha producido contra un lisado purificado de la cepa HTLV-111 B del HIV-1. Este anticuerpo es específico de la proteína 30 estructural del núcleo p24 codificado por gag y del precursor Gag p55.

Resultados

35 **[0053]** La caracterización del inserto genético en el ADN aislado del lote toxicológico (Y511) muestra que el tamaño de los fragmentos A y B amplificados por PCR y la secuencia del inserto son conformes a las expectativas.

[0054] La proporción de virus que expresan la proteína de fusión se ha determinado en una muestra del lote toxicológico antes del llenado (X511E03) y ha mostrado que el 100% de los clones expresan la proteína de fusión.

40 **[0055]** Además, la expresión de la proteína de fusión ha sido evaluada en unas muestras de los lotes de semilla primaria (LSP), lote toxicológico (X511E03) y lote clínico (Z568). La proteína de fusión se ha detectado en todas las muestras, sin que se haya detectado ninguna diferencia con la muestra de control positivo mientras que la proteína de fusión no se podía detectar en las muestras de control negativas.

45 **[0056]** Estos resultados muestran que el vector MVATG17401 es estable genéticamente al nivel de paso del lote clínico Z568 lo que valida por tanto la utilización del lote de semilla primaria para la producción de lotes clínicos al mismo nivel de paso que Z568.

LISTA DE SECUENCIA

50

[0057]

<110> INSERM

<120> Proteína GAG VIH-1 de codificación de gen sintético

55

<130> BET 09P1156

<150> EP 08290849.2

<151> 2008-09-10

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

ES 2 641 915 T3

<210> 1
 <211> 1543
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Gen GAG sintético
 <400> 1

atgggcgcca	gggccagcgt	gctgagcgga	ggcgagctgg	acaggtggga	gaagatcagg	60
ctgaggcctg	gaggcaagaa	gaagtataag	ctgaagcaca	tctgtgtgggc	cagcagggag	120
ctggagaggt	tcgccgtgaa	ccctggcctg	ctggagacca	gcgagggctg	caggcagatc	180
ctggggcagc	tgcagcccag	cctgcagacc	ggcagcgagg	agctgaggag	cctgtacaac	240
accgtggcca	ccctgtactg	cgtgcaccag	aggatcgaga	tcaaggacac	caaggaggcc	300
ctggacaaga	tcgaggagga	gcagaacaag	tccaagaaga	aggcccagca	ggctgctgcc	360
gacaccggcc	acagcagcca	ggtgagccag	aactacccta	tctgtcagaa	catccagggc	420
cagatggtgc	accaggccat	cagccctagg	accctgaacg	cctgggtgaa	ggtggtggag	480
gagaaggcct	tcagcccctga	ggtgatccct	atgttcagcg	ccctgagcga	gggagccaca	540
cctcaggacc	tgaacacat	gctgaacacc	gtgggaggcc	accaggccgc	catgcagatg	600
ctgaaggaga	ccatcaacga	ggaggctgcc	gagtgggaca	gggtgcacc	tgtgcacgct	660
ggaccctcgc	ctccaggcca	gatgagggag	cccagaggca	gcgacatcgc	cggcaccacc	720
agcacccctgc	aggagcagat	cggtctggat	accaacaacc	ctcccatccc	tgtgggcgaa	780
atctacaaga	ggtggatcat	cctgggcctg	aacaagatcg	tgaggatgta	cagccctacc	840
agcatcctgg	atatcaggca	gggccctaaa	gagcccttca	gggactacgt	ggacaggttc	900
tacaagacc	tgagagccga	gcaggccagc	caggaggtga	agaactggat	gaccgagacc	960
ctgctggtgc	agaacgcca	ccctgactgc	aagaccatcc	tgaagccct	gggacctgct	1020
gccaccctgg	aggagatgat	gaccgcctgc	cagggcgtgg	gaggcccagg	ccacaaggcc	1080
agggctgctgg	ccgaggccat	gagccagggtg	accaacaccg	ccaccatcat	gatgcagaga	1140
ggcaacttca	ggaaccagag	gaagatggtg	aagtgcttca	actgcggcaa	ggaggggccac	1200
accgccagga	actgcagggc	tcccaggaag	aagggctgct	ggaagtgcgg	caaggagggc	1260
caccagatga	aggactgcac	cgagagggcag	gccaaacttcc	tgggcaagat	ctggcccagc	1320
tacaagggca	ggccaggcaa	cttctctgcag	agcaggcccg	agcccaccgc	tccaccttcc	1380
ctgcagagca	ggcccagacc	caccgctcct	cctgaggaga	gcttcaggag	cggcgtggag	1440
acaaccacc	ctcctcagaa	gcaggagccc	atcgacaagg	agctgtacc	tctgaccagc	1500
ctgaggagcc	tgttcggcaa	cgaccctagc	agccaggagt	cga		1543

10 <210> 2
 <211> 2388
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> gag -nef-pol sintético
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2388)

20 <400> 2

atg	ggc	agg	gcc	agc	gtg	ctg	agc	gga	ggc	gag	ctg	gac	agg	tgg	48	
Met	Gly	Ala	Arg	Ala	Ser	Val	Leu	Ser	Gly	Gly	Glu	Leu	Asp	Arg	Trp	

ES 2 641 915 T3

ctg gga cct gct gcc acc ctg gag gag atg atg acc gcc tgc cag ggc 1056
 Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
 340 345 350
 gtg gga ggc cca ggc cac aag gcc agg gtg ctg gcc gag gcc atg agc 1104
 Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser
 355 360 365
 cag gtg acc aac acc gcc acc atc atg atg cag aga ggc aac ttc agg 1152
 Gln Val Thr Asn Thr Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
 370 375 380
 aac cag agg aag atg gtg aag tgc ttc aac tgc ggc aag gag ggc cac 1200
 Asn Gln Arg Lys Met Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
 385 390 395 400
 acc gcc agg aac tgc agg gct ccc agg aag aag ggc tgc tgg aag tgc 1248
 Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
 405 410 415
 ggc aag gag ggc cac cag atg aag gac tgc acc gag agg cag gcc aac 1296
 Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
 420 425 430
 ttc ctg ggc aag atc tgg ccc agc tac aag ggc agg cca ggc aac ttc 1344
 Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser Tyr Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe
 435 440 445
 ctg cag agc agg ccc gag ccc acc gct cca cct ttc ctg cag agc agg 1392
 Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Phe Leu Gln Ser Arg
 450 455 460
 ccc gag ccc acc gct cct cct gag gag agc ttc agg agc ggc gtg gag 1440
 Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Phe Arg Ser Gly Val Glu
 465 470 475 480
 aca acc acc cct cct cag aag cag gag ccc atc gac aag gag ctg tac 1488
 Thr Thr Thr Pro Pro Gln Lys Gln Glu Pro Ile Asp Lys Glu Leu Tyr
 485 490 495
 cct ctg acc agc ctg agg agc ctg ttc ggc aac gac cct agc agc cag 1536
 Pro Leu Thr Ser Leu Arg Ser Leu Phe Gly Asn Asp Pro Ser Ser Gln
 500 505 510
 gag tgc acc ggg cca cta aca gaa gaa gca gag cta gaa ctg gca gaa 1584
 Glu Ser Thr Gly Pro Leu Thr Glu Glu Ala Glu Leu Glu Leu Ala Glu
 515 520 525
 aac aga gag att cta aaa gaa cca gta cat gga gtg tat tat gac cca 1632
 Asn Arg Glu Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr Tyr Asp Pro
 530 535 540
 tca aaa gac tta ata gca gaa ata cag aag cag ggg caa ggc caa tgg 1680
 Ser Lys Asp Leu Ile Ala Glu Ile Gln Lys Gln Gly Gln Gly Gln Trp
 545 550 555 560
 aca tat caa att tat caa gag cca ttt aaa aat ctg aaa aca gga atg 1728
 Thr Tyr Gln Ile Tyr Gln Glu Pro Phe Lys Asn Leu Lys Thr Gly Met
 565 570 575
 gag tgg aga ttt gat tct aga tta gca ttt cat cac gta gct aga gaa 1776
 Glu Trp Arg Phe Asp Ser Arg Leu Ala Phe His His Val Ala Arg Glu
 580 585 590
 tta cat cct gaa tat ttt aaa aat tgt aag ctt atg gca ata ttc caa 1824
 Leu His Pro Glu Tyr Phe Lys Asn Cys Lys Leu Met Ala Ile Phe Gln
 595 600 605
 agt agc atg aca aaa atc tta gag cct ttt aga aaa caa aat cca gac 1872
 Ser Ser Met Thr Lys Ile Leu Glu Pro Phe Arg Lys Gln Asn Pro Asp
 610 615 620
 ata gtt atc tat caa tac atg gat gat ttg tat gta gga tct gac tta 1920
 Ile Val Ile Tyr Gln Tyr Met Asp Asp Leu Tyr Val Gly Ser Asp Leu
 625 630 635 640
 gaa ata ggg cag cat aga aca aaa ata gag gag ctg aga caa cat ctg 1968
 Glu Ile Gly Gln His Arg Thr Lys Ile Glu Glu Leu Arg Gln His Leu
 645 650 655
 ttg agg tgg gga ctt aca acc atg gta ggt ttt cca gta aca cct caa 2016

ES 2 641 915 T3

Leu	Arg	Trp	Gly	Leu	Thr	Thr	Met	Val	Gly	Phe	Pro	Val	Thr	Pro	Gln	
			660					665					670			
gta	cct	tta	aga	cca	atg	act	tac	aaa	gca	gct	gta	gat	ctt	tct	cac	2064
Val	Pro	Leu	Arg	Pro	Met	Thr	Tyr	Lys	Ala	Ala	Val	Asp	Leu	Ser	His	
		675					680					685				
ttt	tta	aaa	gaa	aaa	gga	ggt	tta	gaa	ggg	cta	att	cat	tct	caa	cga	2112
Phe	Leu	Lys	Glu	Lys	Gly	Gly	Leu	Glu	Gly	Leu	Ile	His	Ser	Gln	Arg	
		690			695						700					
aga	caa	gat	att	ctt	gat	ttg	tgg	att	tat	cat	aca	caa	gga	tat	ttt	2160
Arg	Gln	Asp	Ile	Leu	Asp	Leu	Trp	Ile	Tyr	His	Thr	Gln	Gly	Tyr	Phe	
		705			710					715				720		
cct	gat	tgg	cag	aat	tac	aca	cca	gga	cca	gga	gtc	aga	tac	cca	tta	2208
Pro	Asp	Trp	Gln	Asn	Tyr	Thr	Pro	Gly	Pro	Gly	Val	Arg	Tyr	Pro	Leu	
				725				730						735		
acc	ttt	ggt	tgg	tgc	tac	aag	cta	gta	cca	atg	att	gag	act	gta	cca	2256
Thr	Phe	Gly	Trp	Cys	Tyr	Lys	Leu	Val	Pro	Met	Ile	Glu	Thr	Val	Pro	
		740						745				750				
gta	aaa	tta	aag	cca	gga	atg	gat	ggc	cca	aaa	gtt	aaa	caa	tgg	cca	2304
Val	Lys	Leu	Lys	Pro	Gly	Met	Asp	Gly	Pro	Lys	Val	Lys	Gln	Trp	Pro	
		755			760							765				
ttg	aca	gaa	gaa	aaa	ata	aaa	gca	tta	gta	gaa	att	tgt	aca	gag	atg	2352
Leu	Thr	Glu	Glu	Lys	Ile	Lys	Ala	Leu	Val	Glu	Ile	Cys	Thr	Glu	Met	
		770			775						780					
gaa	aag	gaa	ggg	aaa	att	tca	aaa	att	ggg	cct	taa					2388
Glu	Lys	Glu	Gly	Lys	Ile	Ser	Lys	Ile	Gly	Pro						
		785			790					795						

<210> 3

<211> 795

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 3

10

ES 2 641 915 T3

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	Ile	Lys	Asp	85	90	95	
Thr	Lys	Glu	Ala	Leu	Asp	Lys	Ile	Glu	Glu	Glu	Gln	Asn	Lys	Ser	Lys	100	105	110	
Lys	Lys	Ala	Gln	Gln	Ala	Ala	Ala	Asp	Thr	Gly	His	Ser	Ser	Gln	Val	115	120	125	
Ser	Gln	Asn	Tyr	Pro	Ile	Val	Gln	Asn	Ile	Gln	Gly	Gln	Met	Val	His	130	135	140	

ES 2 641 915 T3

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu
 145 150 155 160
 Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
 165 170 175
 Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly
 180 185 190
 Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu
 195 200 205
 Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val 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 Ala Glu Ala Met Ser
 355 360 365
 Gln Val Thr Asn Thr Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
 370 375 380
 Asn Gln Arg Lys Met Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
 385 390 395 400
 Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
 405 410 415
 Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
 420 425 430
 Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser Tyr Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe
 435 440 445
 Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Phe Leu Gln Ser Arg
 450 455 460

ES 2 641 915 T3

Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Phe Arg Ser Gly Val Glu
 465 470 475 480
 Thr Thr Thr Pro Pro Gln Lys Gln Glu Pro Ile Asp Lys Glu Leu Tyr
 485 490 495
 Pro Leu Thr Ser Leu Arg Ser Leu Phe Gly Asn Asp Pro Ser Ser Gln
 500 505 510
 Glu Ser Thr Gly Pro Leu Thr Glu Glu Ala Glu Leu Glu Leu Ala Glu
 515 520 525
 Asn Arg Glu Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr Tyr Asp Pro
 530 535 540
 Ser Lys Asp Leu Ile Ala Glu Ile Gln Lys Gln Gly Gln Gly Gln Trp
 545 550 555 560
 Thr Tyr Gln Ile Tyr Gln Glu Pro Phe Lys Asn Leu Lys Thr Gly Met
 565 570 575
 Glu Trp Arg Phe Asp Ser Arg Leu Ala Phe His His Val Ala Arg Glu
 580 585 590
 Leu His Pro Glu Tyr Phe Lys Asn Cys Lys Leu Met Ala Ile Phe Gln
 595 600 605
 Ser Ser Met Thr Lys Ile Leu Glu Pro Phe Arg Lys Gln Asn Pro Asp
 610 615 620
 Ile Val Ile Tyr Gln Tyr Met Asp Asp Leu Tyr Val Gly Ser Asp Leu
 625 630 635 640
 Glu Ile Gly Gln His Arg Thr Lys Ile Glu Glu Leu Arg Gln His Leu
 645 650 655
 Leu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Met Val Gly Phe Pro Val Thr Pro Gln
 660 665 670
 Val Pro Leu Arg Pro Met Thr Tyr Lys Ala Ala Val Asp Leu Ser His
 675 680 685
 Phe Leu Lys Glu Lys Gly Gly Leu Glu Gly Leu Ile His Ser Gln Arg
 690 695 700
 Arg Gln Asp Ile Leu Asp Leu Trp Ile Tyr His Thr Gln Gly Tyr Phe
 705 710 715 720
 Pro Asp Trp Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Pro Gly Val Arg Tyr Pro Leu
 725 730 735
 Thr Phe Gly Trp Cys Tyr Lys Leu Val Pro Met Ile Glu Thr Val Pro
 740 745 750
 Val Lys Leu Lys Pro Gly Met Asp Gly Pro Lys Val Lys Gln Trp Pro
 755 760 765
 Leu Thr Glu Glu Lys Ile Lys Ala Leu Val Glu Ile Cys Thr Glu Met
 770 775 780

ES 2 641 915 T3

Glu Lys Glu Gly Lys Ile Ser Lys Ile Gly Pro
785 790 795

- <210> 4
- <211> 6000
- 5 <212> ADN
- <213> artificial
- <220>
- <223> Fragmento del vector pTG17401
- <400> 4

10	aaataaatca	tataaaaaat	gatttcacga	ttaaacccatg	ttgtgaaaaa	gtcaagaacg	60
	ttcacattgg	cggacaatct	aaaaacaata	cagtgattgc	agatttgcca	tatatggata	120
	atgcggtatc	cgatgatgc	aattcactgt	ataaaaagaa	tgtatcaaga	atatccagat	180
	ttgctaattt	gataaagata	gatgacgatg	acaagactcc	tactggtgta	tataattatt	240
	ttaaacctaa	agatgccatt	cctgttatta	tatccatagg	aaaggataga	gatgtttgtg	300
	aactattaat	ctcatctgat	aaagcgtgtg	cgtgtataga	gttaaattca	tataaagtag	360
	ccattcttcc	catggatggt	tcctttttta	ccaaaggaaa	tgcatcattg	attattctcc	420
	tgtttgattt	ctctatcgat	gcggcacctc	tcttaagaag	tgtaaccgat	aataatgtta	480
	ttatatctag	acaccagcgt	ctacatgacg	agcttccgag	ttccaattgg	ttcaagtttt	540
	acataagtat	aaagtccgac	tattgttcta	tattatatat	ggttggtgat	ggatctgtga	600
	tgcatgcaat	agctgataat	agaacttacg	caaatattag	caaaaatata	ttagacaata	660
	ctacaattaa	cgatgagtgt	agatgctggt	attttgaacc	acagattagg	attcttgata	720
	gagatgagat	gctcaatgga	tcacgtgtgt	atatgaacag	acattgtatt	atgatgaatt	780
	tacctgatgt	aggcgaattt	ggatctagta	tgttggggaa	atatgaacct	gacatgatta	840
	agattgctct	ttcgggtggct	ggtgagctcg	gatctaagct	tgtcgcacata	aaaatatagt	900
	agaatttcat	ttgttttttt	ctatgctata	aataggatcg	atccgataaa	gtgaaaaata	960
	attctaattt	attgcacggt	aagggaagtag	aatcataaag	aaaagcttct	gcaggtcgac	1020
	atggtgagca	agggcgagga	gctgttcacc	ggggtggtgc	ccatcctggt	cgagctggac	1080
	ggcgacgtaa	acggccacaa	gttcagcgtg	tccggcgagg	gcgagggcga	tgccacctac	1140
	ggcaagctga	ccctgaagtt	catctgcacc	accggcaagc	tgcccgtgcc	ctggcccacc	1200
	ctcgtgacca	ccctgacctc	cggcgtgcag	tgcttcagcc	gctaccccga	ccacatgaag	1260
	cagcacgact	tcttcaagtc	cgccatgccc	gaaggctacg	tccaggagcg	caccatcttc	1320
	ttcaaggacg	acggcaacta	caagaccgcg	gccgaggtga	agttcgaggg	cgacaccttg	1380
	gtgaaccgca	tcgagctgaa	gggcatcgac	ttcaaggagg	acggcaacat	cctggggcac	1440
	aaactggagt	acaactacaa	cagccacaac	gtctatatca	tggccgacaa	gcagaagaac	1500
	ggcatcaagg	tgaacttcaa	gatccgccac	aacatcgagg	acggcagcgt	gcagctcgcc	1560
	gaccactacc	agcagaacac	ccccatcggc	gacggccccg	tgtgtctgcc	cgacaaccac	1620
	tacctgagca	cccagtcocg	cttgagcaaa	gaccccacag	agaagcgcga	tcacatggtc	1680
	ctgctggagt	tcgtgaccgc	cgccgggatc	actctcgcca	tggacgagct	gtacaagagc	1740
	gaaaaataca	tcgtcacctg	ggacatggtg	cagatccatg	cacgtaaact	cgcaagccga	1800
	ctgatgcctt	ctgaacaatg	gaaaggcatt	attgccgtaa	gccgtggcgg	tctggtaccg	1860
	ggtgcgttac	tggcgcgtga	actgggtatt	cgctcatgtc	ataccgtttg	tatttccagg	1920
	tacgatcacg	acaaccagcg	cgagcttaaa	gtgctgaaac	gcgcagaagg	cgatggcgaa	1980
	ggcttcatcg	ttattgatga	cctggtggat	accggtggta	ctgcggttgc	gattcgtgaa	2040
	atgtatccaa	aagcgcactt	tgtcaccatc	ttcgcaaaac	cggtgtgtcg	tccgctgggt	2100
	gatgactatg	ttgttgatat	cccgcaagat	acctggattg	aacagccgtg	ggatatgggc	2160
	gtcgtattcg	tcccgcfaat	ctccggtcgc	taatcttttc	aacgcctggc	actgccgggc	2220
	gttgttcttt	ttaacttccc	tgcataatta	acgatgagtg	tagatgctgt	tattttgaac	2280
	cacagattag	gattcttgat	agagatgaga	tgctcaatgg	atcatcgtgt	gatatgaaca	2340
	gacattgtat	tatgatgaat	ttacctgatg	taggcgaatt	tggatctagt	atgttgggga	2400
	aatatgaacc	tgacatgatt	aagattgctc	ttcgggtggc	tgggtgagctc	ggatctttta	2460
	ttctataact	aaaaaatgaa	aataaataca	aaggttcttg	agggttgtgt	taaattgaaa	2520
	gcgagaanaa	atcataaatt	atctcattat	cgcgatatcc	gttaagtttg	ctgcagctgg	2580
	atccatgggc	cccagggccca	cgctgctgag	cggaggcgag	ctggacaggt	gggagaagat	2640
	caggctgagg	cctggaggca	agaagaagta	taagctgaag	cacatcgtgt	gggccagcag	2700
	ggagctggag	aggttcgccg	tgaaccctgg	cctgctggag	accagcagag	gctgcaggca	2760
	gatcctgggc	cagctgcagc	ccagcctgca	gaccggcagc	gaggagctga	ggagcctgta	2820
	caacaccgtg	gccaccctgt	actgcgtgca	ccagaggatc	gagatcaagg	acaccaagga	2880
	ggccctggac	aagatcgagg	aggagcagaa	caagtccaag	agaagggccc	agcaggtctgc	2940
	tgccgacacc	ggccacagca	gccaggtgag	ccagaactac	cctatcgtgc	agaacatcca	3000
	gggccagatg	gtgcaccagg	ccatcagccc	taggaccctg	aacgcctggg	tgaaggtggt	3060

ES 2 641 915 T3

ggaggagaag gccttcagcc ctgaggtgat ccctatgttc agcgcctga gcgagggagc 3120
 cacacctcag gacctgaaca ccatgctgaa cacctggtga ggccaccagg ccgccatgca 3180
 gatgctgaag gagaccatca acgaggaggc tgccgagtgg gacagggtgc accctgtgca 3240
 cgctggaccc atcgctccag gccagatgag ggagcccaga ggcagcgaca tcgcccggcac 3300
 caccagcacc ctgcaggagc agatcggtg gatgaccaac aacctccca tcctgtggg 3360
 cgaaatctac aagaggtgga tcctctggg cctgaacaag atcgtgagga tgtacagccc 3420
 taccagcatc ctggatatca ggcagggcc taaagagccc ttcagggact acgtggacag 3480
 gttctacaag accctgagag ccgagcaggc cagccaggag gtgaagaact ggatgaccga 3540
 gaccctgctg gtgcagaacg ccaaccctga ctgcaagacc atcctgaagg ccctgggacc 3600
 tgctgccacc ctggaggaga tgatgaccgc ctgcccaggc gtgggaggcc caggccaca 3660
 ggccagggtg ctggccgagg ccatgagcca ggtgaccaac accgccacca tcatgatgca 3720
 gagaggcaac ttcaggaacc agaggaagat ggtgaagtgc ttcaactgcg gcaaggaggg 3780
 ccacaccgcc aggaactgca gggctcccag gaagaaggc tgctggaagt gcggcaagga 3840
 gggccaccag atgaaggact gcaccgagag gcaggccaac ttcctgggca agatctggcc 3900
 cagctacaag ggcaggccag gcaacttct ccagagcagg cccgagcca ccgctccacc 3960
 tttcctgcag agcaggccg agcccaccg tctcctgag gagagctca ggagcggcgt 4020
 ggagacaacc accctcctc agaagcagga gcccatcgac aaggagctgt accctctgac 4080
 cagcctgagg agcctgttcg gcaacgacc tagcagccag gactcgacc ggccactaac 4140
 agaagaagca gagctagaac tggcagaaaa cagagagatt ctaaaagaac cagtacatgg 4200
 agtgtattat gacccatcaa aagacttaat agcagaaata cagaagcagg ggcaaggcca 4260
 atggacatat caaattatc aagagccatt taaaaatctg taaaaagaa aaagaggtt tggagtggag 4320
 atttgattct agattagcat ttcacacgt agctagagaa ttacatcctg aatattttaa 4380
 aaattgtaag cttatggcaa tattccaaag tagcatgaca aaaatcttag agccttttag 4440
 aaaacaaaat ccagacatag ttatctatca atacatggat gatttgtatg taggatctga 4500
 cttagaaata gggcagcata gaacaaaaat agaggagctg agacaacatc tgttgaggtg 4560
 gggacttaca accatggtag gttttccagt aacacctcaa gtacctttaa gaccaatgac 4620
 ttacaaagca gctgtagatc tttctcactt tttaaaagaa aaaggaggtt tagaagggct 4680
 aattcattct caacgaagac aagatattct tgatttggg atttatcata cacaaggata 4740
 ttttctgat tggcagaatt acacaccagg accaggagtc agatacccat taaccttgg 4800
 ttggtgctac aagctagtac caatgattga gactgtacca gtaaaattaa agccaggaat 4860
 ggatggcca aaagttaaac aatggccatt gacagaagaa aaaataaaag cattagtaga 4920
 aatttgata gagatggaaa aggaagggaa aatttcaaaa attgggcctt aagcggccgc 4980
 cccgggagat ctcgatccgg aaagttttat aggtagttga tagaacaaaa tacataattt 5040
 tgtaaaata aatcactttt tatactaata tgacacgatt accaatactt ttgttactaa 5100
 tatcattagt atacgtaca cttttcctc agacatctaa aaaaataggt gatgatgcaa 5160
 ctttatcatg taatcgaat aatacaaatg actacgttgt tatgagtgtc tggataaagg 5220
 agcccaattc cattattctt ttagtgtcta aaagcgactt cttgtatttt gataattata 5280
 ccaaggataa aatatcttac gactctccat acgatgatct agttacaact atcacaatta 5340
 aatcattgac tgctagagat gccggtactt atgtatgtgc attctttatg acatcgcta 5400
 caaatgacac tgataaagta gattatgaag aatactccac agagttgatt gtaaatacag 5460
 atagtgaatc gactatagac ataatactat ctggatctac acattcaccg gaaactagtt 5520
 ctgagaaacc tgattatata gataattcta atgtctcgtc ggtattcgaa atcgcgactc 5580
 cggaaccaat tactgataat gtagaagatc atacagacac cgtcacatac actagtgata 5640
 gcattaatac agtaagtgca tcactctggag aatccacaac agacgagact ccggaaccaa 5700
 ttactgataa agaagaagat catacagtta cagacactgt ctatacact acagtaagta 5760
 catcatctgg aattgtcact actaaatcaa ccaccgatga tgccgatctt tatgatacgt 5820
 acaatgataa tgatacagta ccatcaacta ctgtaggcgg tagtacaacc tctattagca 5880
 attataaaac caaggacttt gtagaatat ttggtattac cgcattaatt atattgtcgg 5940
 ccgtggcaat attctgtatt acatattata tatataataa acgttcacgt aaatacaaa 6000

- <210> 5
- <211> 20
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> iniciador
- <400> 5

- 10 catgacgagc ttccgagttc
- <210> 6
- <211> 27
- <212> ADN

20

ES 2 641 915 T3

<213> Artificial
<220>
<223> iniciador
<400> 6
5 gttgaagcac ttcacatct tcctctg 27
<210> 7
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial
10 <220>
<223> iniciador
<400> 7
cctgaacaag atcgtgagga tg 22
<210> 8
15 <211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<400> 8
gctcctata ccaagcactc 20
20

REIVINDICACIONES

1. Polinucleótido que codifica la proteína Gag (p55) de VIH-1, **caracterizado porque** se define por la secuencia SEQ ID NO: 1.
5
2. Polinucleótido recombinante que codifica una proteína de fusión que comprende la proteína Gag (p55) de VIH-1, fusionada con uno o varios polipéptido(s) diferente(s) de VIH, **caracterizado porque** comprende la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 10 3. Polinucleótido recombinante según la reivindicación 2, **caracterizado porque** dicho o dichos polipéptido(s) diferente(s) de VIH se escoge(n) entre la proteína Pol, la proteína Nef, la proteína Env o cualquier fragmento de dichas proteínas que llevan al menos un epítipo reconocido por unos anticuerpos anti-VIH o por unos linfocitos T citotóxicos CTLs anti-VIH.
- 15 4. Polinucleótido recombinante según la reivindicación 3, **caracterizado porque** se define por la secuencia SEQ ID NO: 2.
5. Vector recombinante que comprende un polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4.
20
6. Vector recombinante según la reivindicación 5, **caracterizado porque** se trata de un poxvirus atenuado.
7. Vector recombinante según la reivindicación 6, **caracterizado porque** dicho poxvirus es el virus 25 Ankara modificado (MVA).
8. Utilización de un vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones de 5 a 7, para la obtención de una vacuna anti-VIH.
- 30 9. Composición inmunógena que comprende un vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones de 5 a 7.
10. Composición de vacunación que comprende un vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones de 5 a 7.
35
11. Vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones de 5 a 7 para su utilización para inducir una respuesta inmune en el caso de un sujeto por su administración a un sujeto que lo necesite.
12. Vector recombinante según cualquiera de las reivindicaciones de 5 a 7 para su utilización para la 40 prevención o el tratamiento de una infección por el VIH por su administración a un sujeto que lo necesite.

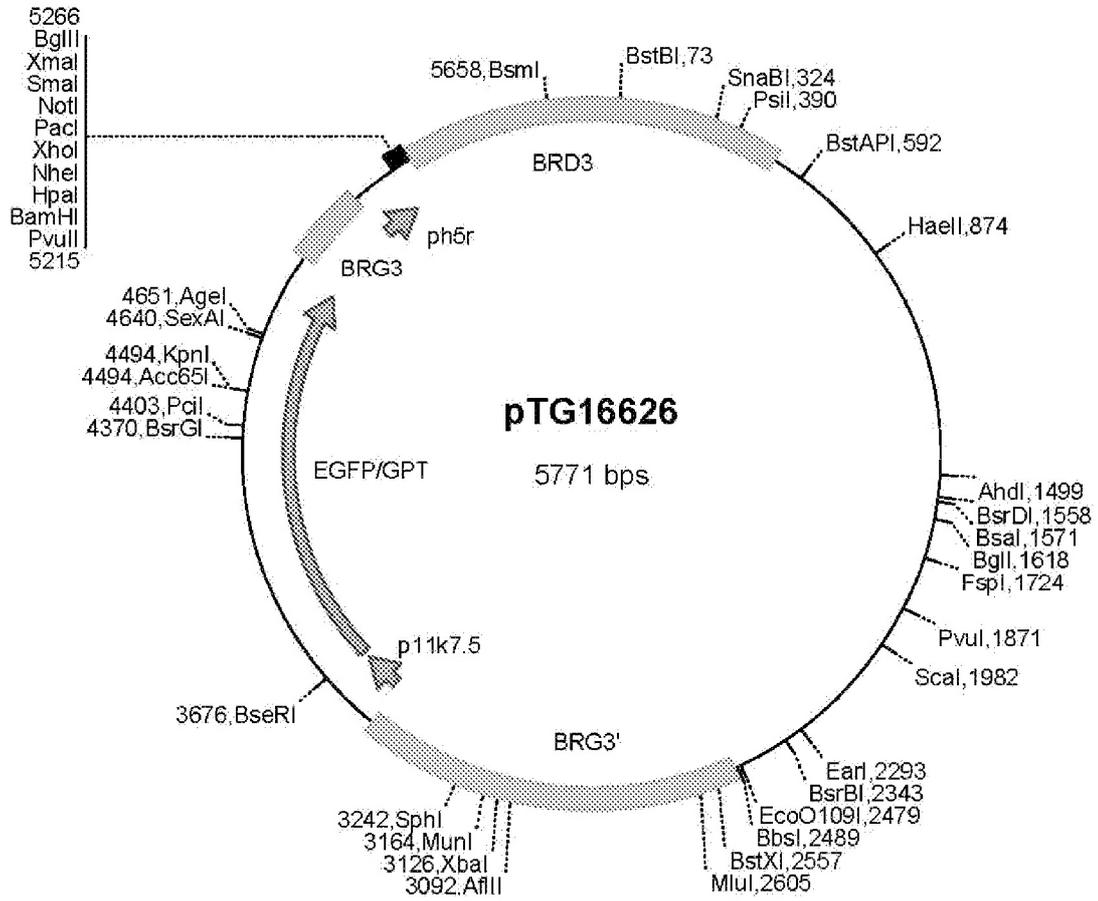


FIG.1

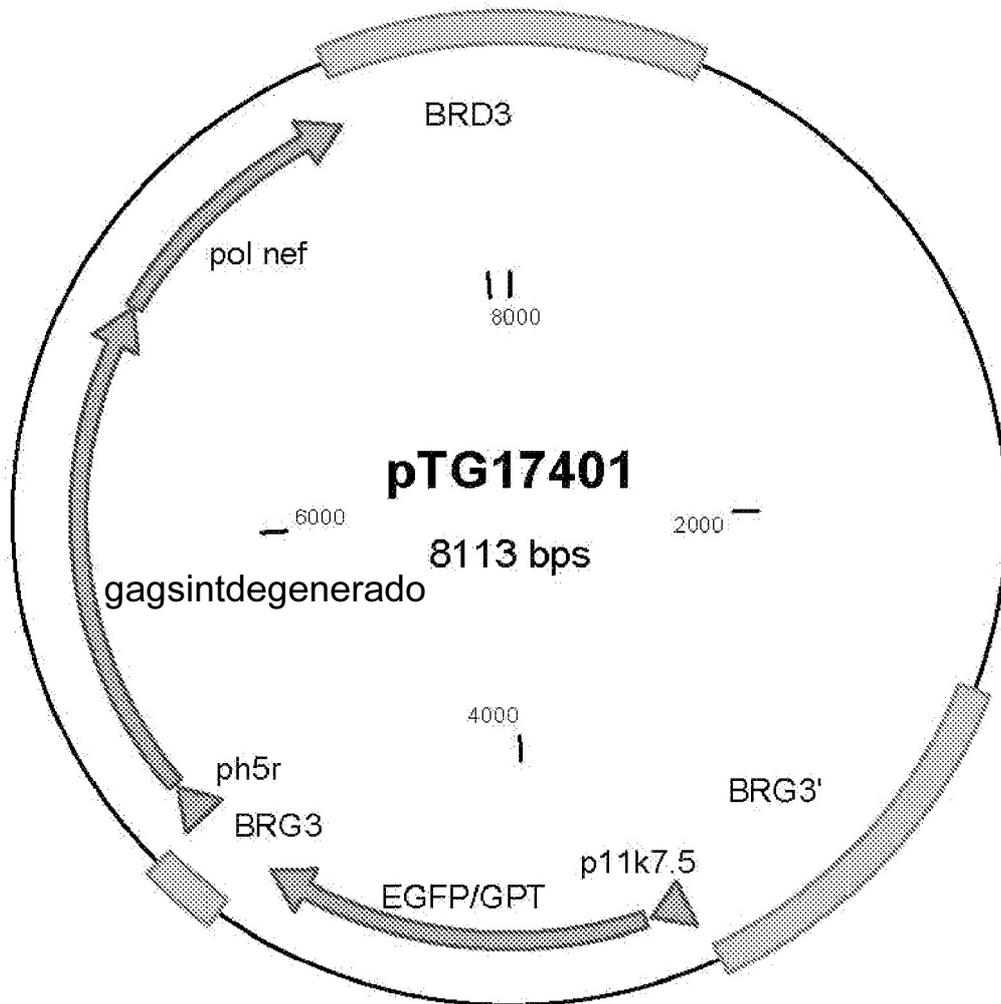


FIG.2

ES 2 641 915 T3

```
1 50
F-PTG17401 AAATAAATCA TATAAAAAAT GATTTTCATGA TTAAACCATG TTGTGAAAAA

51 100
F-PTG17401 GTCAAGAACG TTCACATTGG CGGACAATCT AAAAACAATA CAGTGATTGC

101 150
F-PTG17401 AGATTTGCCA TATATGGATA ATGCGGTATC CGATGTATGC AATTCACTGT

151 200
F-PTG17401 ATAAAAAGAA TGTATCAAGA ATATCCAGAT TTGCTAATTT GATAAAGATA

201 250
F-PTG17401 GATGACGATG ACAAGACTCC TACTGGTGTA TATAATTATT TTAAACCTAA

251 300
F-PTG17401 AGATGCCATT CCTGTTATTA TATCCATAGG AAAGGATAGA GATGTTTGTG

301 350
F-PTG17401 AACTATTAAT CTCATCTGAT AAAGCGTGTG CGTGTATAGA GTTAAATTCA

351 400
F-PTG17401 TATAAAGTAG CCATTCTTCC CATGGATGTT TCCTTTTTTTA CCAAAGGAAA

401 450
F-PTG17401 TGCATCATTG ATTATTCTCC TGTTTGATTT CTCTATCGAT GCGGCACCTC

451 500
F-PTG17401 TCTTAAGAAG TGTAACCGAT AATAATGTTA TTATATCTAG ACACCAGCGT

501 550
F-PTG17401 CTACATGACG AGCTTCCGAG TTCCAATTGG TTCAAGTTTT ACATAAGTAT

551 600
F-PTG17401 AAAGTCCGAC TATTGTTCTA TATTATATAT GGTGTTGAT GGATCTGTGA

601 650
F-PTG17401 TGCATGCAAT AGCTGATAAT AGAACTTACG CAAATATTAG CAAAAATATA

651 700
F-PTG17401 TTAGACAATA CTACAATTAA CGATGAGTGT AGATGCTGTT ATTTTGAACC

701 750
F-PTG17401 ACAGATTAGG ATTCTTGATA GAGATGAGAT GCTCAATGGA TCATCGTGTG

751 800
F-PTG17401 ATATGAACAG ACATTGTATT ATGATGAATT TACCTGATGT AGGCGAATTT

801 850
F-PTG17401 GGATCTAGTA TGTGGGGAA ATATGAACCT GACATGATTA AGATTGCTCT

851 900
F-PTG17401 TTCGGTGGCT GGTGAGCTCG GATCTAAGCT TGTCGACATA AAAATATAGT
```

FIG.3 (Inicio)

ES 2 641 915 T3

F-PTG17401 901 950
AGAATTTTCAT TTGTTTTTTTT CTATGCTATA AATAGGATCG ATCCGATAAA

F-PTG17401 951 1000
GTGAAAAATA ATTCTAATTT ATTGCACGGT AAGGAAGTAG AATCATAAAG

F-PTG17401 1001 1050
AAAAGCTTCT GCAGGTCGAC ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTTACC

F-PTG17401 1051 1100
GGGGTGGTGC CCATCCTGGT CGAGCTGGAC GGGGACGTAA ACGGCCACAA

F-PTG17401 1101 1150
GTTGAGCGTG TCCGGCGAGG GCGAGGGCGA TGCCACCTAC GGCAAGCTGA

F-PTG17401 1151 1200
CCCTGAAGTT CATCTGCACC ACCGGCAAGC TGCCCGTGCC CTGGCCCACC

F-PTG17401 1201 1250
CTCGTGACCA CCCTGACCTA CGGCGTGCAG TGCTTCAGCC GCTACCCCGA

F-PTG17401 1251 1300
CCACATGAAG CAGCAGACT TCTTCAAGTC CGCCATGCCC GAAGGCTACG

F-PTG17401 1301 1350
TCCAGGAGCG CACCATCTTC TTCAAGGACG ACGGCAACTA CAAGACCCCG

F-PTG17401 1351 1400
GCCGAGGTGA AGTTCGAGGG CGACACCCTG GTGAACCGCA TCGAGCTGAA

F-PTG17401 1401 1450
GGGCATCGAC TTCAAGGAGG ACGGCAACAT CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT

F-PTG17401 1451 1500
ACAACTACAA CAGCCACAAC GTCTATATCA TGGCCGACAA GCAGAAGAAC

F-PTG17401 1501 1550
GGCATCAAGG TGAACTTCAA GATCCGCCAC AACATCGAGG ACGGCAGCGT

F-PTG17401 1551 1600
GCAGCTCGCC GACCACTACC AGCAGAACAC CCCCATCGGC GACGGCCCCG

F-PTG17401 1601 1650
TGCTGCTGCC CGACAACCAC TACCTGAGCA CCCAGTCCGC CCTGAGCAAA

F-PTG17401 1651 1700
GACCCCAACG AGAAGCGCGA TCACATGGTC CTGCTGGAGT TCGTGACCGC

F-PTG17401 1701 1750
CGCCGGGATC ACTCTCGGCA TGGACGAGCT GTACAAGAGC GAAAAATACA

F-PTG17401 1751 1800
TCGTCACCTG GGACATGTTG CAGATCCATG CACGTAAACT CGCAAGCCGA

FIG.3 (Continuación)

ES 2 641 915 T3

F-PTG17401 1801 1850
CTGATGCCTT CTGAAACAATG GAAAGGCATT ATTGCCGTAA GCCGTGGCGG

F-PTG17401 1851 1900
TCTGGTACCG GGTGCGTTAC TGGCGCGTGA ACTGGGTATT CGTCATGTCG

F-PTG17401 1901 1950
ATACCGTTTG TATTTCCAGC TACGATCAGC ACAACCAGCG CGAGCTTAAA

F-PTG17401 1951 2000
GTGCTGAAAC GCGCAGAAGG CGATGGCGAA GGCTTCATCG TTATTGATGA

F-PTG17401 2001 2050
CCTGGTGGAT ACCGGTGGTA CTGCCGTTGC GATTGCTGAA ATGTATCCAA

F-PTG17401 2051 2100
AAGCGCACTT TGTACCATC TTCGCAAAAC CCGCTGGTCC TCCGCTGGTT

F-PTG17401 2101 2150
GATGACTATG TTGTTGATAT CCCGCAAGAT ACCTGGATTG AACAGCCGTG

F-PTG17401 2151 2200
GGATATGGGC GTCGTATTCG TCCCGCCAAT CTCCGGTCCG TAATCTTTTT

F-PTG17401 2201 2250
AACGCCTGGC ACTGCCGGGC GTTGTCTCTT TTAACCTCCC TGCATAATTA

F-PTG17401 2251 2300
ACGATGAGTG TAGATGCTGT TATTTTGAAC CACAGATTAG GATTCTTGAT

F-PTG17401 2301 2350
AGAGATGAGA TGCTCAATGG ATCATCGTGT GATATGAACA GACATTGTAT

F-PTG17401 2351 2400
TATGATGAAT TTACCTGATG TAGGCCAATT TGGATCTAGT ATGTTGGGGA

F-PTG17401 2401 2450
AATATGAACC TGACATGATT AAGATTGCTC TTTCGGTGGC TGGTGAGCTC

F-PTG17401 2451 2500
GGATCTTTTA TTCTATACTT AAAAAATGAA AATAAATACA AAGGTCTTTG

F-PTG17401 2501 2550
AGGGTTGTGT TAAATTGAAA GCGAGAAATA ATCATAAATT ATTCATTAT

F-PTG17401 2551 2600
CGCGATATCC GTTAAGTTTG CTGCAGCTGG ATCCATGGGC GCCAGGGCCA

F-PTG17401 2601 2650
GCGTGCTGAG CGGAGGCGAG CTGGACAGGT GGGAGAAGAT CAGGCTGAGG

F-PTG17401 2651 2700
CCTGGAGGCA AGAAGAAGTA TAAGCTGAAG CACATCGTGT GGGCCAGCAG

FIG.3 (Continuación)

ES 2 641 915 T3

F-PTG17401	2701 GGAGCTGGAG AGGTTCGCCG TGAACCCCTGG CCTGCTGGAG ACCAGCGAGG	2750
F-PTG17401	2751 GCTGCAGGCA GATCCTGGGC CAGCTGCAGC CCAGCCTGCA GACCGGCAGC	2800
F-PTG17401	2801 GAGGAGCTGA GGAGCCTGTA CAACACCGTG GCCACCCCTGT ACTGCGTGCA	2850
F-PTG17401	2851 CCAGAGGATC GAGATCAAGG ACACCAAGGA GGCCCTGGAC AAGATCGAGG	2900
F-PTG17401	2901 AGGAGCAGAA CAAGTCCAAG AAGAAGGCC AGCAGGCTGC TGCCGACACC	2950
F-PTG17401	2951 GGCCACAGCA GCCAGGTGAG CCAGAACTAC CCTATCCTGC AGAACATCCA	3000
F-PTG17401	3001 GGCCAGATG GTGCACCAGG CCATCAGCCC TAGGACCCCTG AACGCCTGGG	3050
F-PTG17401	3051 TGAAGGTGGT GGAGGAGAAG GCCTTCAGCC CTGAGGTGAT CCCTATGTTC	3100
F-PTG17401	3101 AGCGCCCTGA GCGAGGGAGC CACACCTCAG GACCTGAACA CCATGCTGAA	3150
F-PTG17401	3151 CACCGTGGGA GGCCACCAGG CCGCCATGCA GATGCTGAAG GAGACCATCA	3200
F-PTG17401	3201 ACGAGGAGGC TGCCGAGTGG GACAGGGTGC ACCCTGTGCA CGCTGGACCC	3250
F-PTG17401	3251 ATCGCTCCAG GCCAGATGAG GGAGCCCAGA GGCAGCGACA TCGCCGGCAC	3300
F-PTG17401	3301 CACCAGCACC CTGCAGGAGC AGATCGGCTG GATGACCAAC AACCCCTCCA	3350
F-PTG17401	3351 TCCCTGTGGG CGAAATCTAC AAGAGGTGGA TCATCCTGGG CCTGAACAAG	3400
F-PTG17401	3401 ATCGTGAGGA TGTACAGCCC TACCAGCATC CTGGATATCA GGCAGGGCCC	3450
F-PTG17401	3451 TAAAGAGCCC TTCAGGGACT ACGTGGACAG GTTCTACAAG ACCCTGAGAG	3500
F-PTG17401	3501 CCGAGCAGGC CAGCCAGGAG GTGAAGAACT GGATGACCGA GACCCTGCTG	3550
F-PTG17401	3551 GTGCAGAACG CCAACCCTGA CTGCAAGACC ATCCTGAAGG CCCTGGGACC	3600

FIG.3 (Continuación)

ES 2 641 915 T3

F-PTG17401	3601	TGCTGCCACC CTGGAGGAGA TGATGACCGC CTGCCAGGGC GTGGGAGGCC	3650
F-PTG17401	3651	CAGGCCACAA GGCCAGGGTG CTGGCCGAGG CCATGAGCCA GGTGACCAAC	3700
F-PTG17401	3701	ACCGCCACCA TCATGATGCA GAGAGGCAAC TTCAGGAACC AGAGGAAGAT	3750
F-PTG17401	3751	GGTGAAGTGC TTCAACTGCG GCAAGGAGGG CCACACCGCC AGGAACTGCA	3800
F-PTG17401	3801	GGGCTCCCAG GAAGAAGGGC TGCTGGAAGT GCGGCAAGGA GGGCCACCAG	3850
F-PTG17401	3851	ATGAAGGACT GCACCGAGAG GCAGGCCAAC TTCCTGGGCA AGATCTGGCC	3900
F-PTG17401	3901	CAGCTACAAG GGCAGGCCAG GCAACTTCCT GCAGAGCAGG CCCGAGCCCA	3950
F-PTG17401	3951	CCGCTCCACC TTCCTGCAG AGCAGGCCCG AGCCCAACCGC TCCTCCTGAG	4000
F-PTG17401	4001	GAGAGCTTCA GGAGCGGGT GGAGACAACC ACCCCTCCTC AGAAGCAGGA	4050
F-PTG17401	4051	GCCCATCGAC AAGGAGCTGT ACCCTCTGAC CAGCCTGAGG AGCCTGTTCG	4100
F-PTG17401	4101	GCAACGACCC TAGCAGCCAG GAGTCGACCG GGCCACTAAC AGAAGAAGCA	4150
F-PTG17401	4151	GAGCTAGAAC TGGCAGAAAA CAGAGAGATT CTAAAAGAAC CAGTACATGG	4200
F-PTG17401	4201	AGTGTATTAT GACCCATCAA AAGACTTAAT AGCAGAAATA CAGAAGCAGG	4250
F-PTG17401	4251	GGCAAGGCCA ATGGACATAT CAAATTTATC AAGAGCCATT TAAAAATCTG	4300
F-PTG17401	4301	AAAACAGGAA TGGAGTGGAG ATTTGATTCT AGATTAGCAT TTCATCACGT	4350
F-PTG17401	4351	AGCTAGAGAA TTACATCCTG AATATTTTAA AAATTGTAAG CTTATGGCAA	4400
F-PTG17401	4401	TATCCAAAG TAGCATGACA AAAATCTTAG AGCCTTTTAG AAAACAAAAT	4450
F-PTG17401	4451	CCAGACATAG TTATCTATCA ATACATGGAT GATTTGTATG TAGGATCTGA	4500

FIG.3 (Continuación)

ES 2 641 915 T3

F-PTG17401	4501	4550
	CTTAGAAATA GGGCAGCATA GAACAAAAAT AGAGGAGCTG AGACAACATC	
F-PTG17401	4551	4600
	TGTTGAGGTG GGGACTTACA ACCATGGTAG GTTTTCCAGT AACACCTCAA	
F-PTG17401	4601	4650
	GTACCTTTAA GACCAATGAC TTACAAAGCA GCTGTAGATC TTTCTCACTT	
F-PTG17401	4651	4700
	TTTAAAAGAA AAAGGAGGTT TAGAAGGGCT AATTCATTCT CAACGAAGAC	
F-PTG17401	4701	4750
	AAGATATTCT TGATTTGTGG ATTTATCATA CACAAGGATA TTTTCCTGAT	
F-PTG17401	4751	4800
	TGGCAGAATT ACACACCAGG ACCAGGAGTC AGATACCCAT TAACCTTTGG	
F-PTG17401	4801	4850
	TTGGTGCTAC AAGCTAGTAC CAATGATTGA GACTGTACCA GTAAAATTAA	
F-PTG17401	4851	4900
	AGCCAGGAAT GGATGGCCCA AAAGTTAAAC AATGGCCATT GACAGAAGAA	
F-PTG17401	4901	4950
	AAAATAAAAG CATTAGTAGA AATTTGTACA GAGATGGAAA AGGAAGGGAA	
F-PTG17401	4951	5000
	AATTTCAAAA ATTTGGGCTT AAGCGGCCGC CCCGGGAGAT CTCGATCCGG	
F-PTG17401	5001	5050
	AAAGTTTTAT AGGTAGTTGA TAGAACAAAA TACATAATTT TGTAAAATA	
F-PTG17401	5051	5100
	AATCACTTTT TATACTAATA TGACACGATT ACCAATACTT TTGTTACTAA	
F-PTG17401	5101	5150
	TATCATTAGT ATACGCTACA CCTTTTCCTC AGACATCTAA AAAAAATAGT	
F-PTG17401	5151	5200
	GATGATGCAA CTTTATCATG TAATCGAAAT AATACAAATG ACTACGTTGT	
F-PTG17401	5201	5250
	TATGAGTGCT TGGTATAAGG AGCCCAATTC CATTATTCTT TTAGCTGCTA	
F-PTG17401	5251	5300
	AAAGCGACGT CTTGTATTTT GATAATTATA CCAAGGATAA AATATCTTAC	
F-PTG17401	5301	5350
	GACTCTCCAT ACGATGATCT AGTTACAAC TACACAATTA AATCATTTGAC	
F-PTG17401	5351	5400
	TGCTAGAGAT GCCGGTACTT ATGTATGTGC ATTCTTTATG ACATCGCCTA	

FIG.3 (Continuación)

ES 2 641 915 T3

F-PTG17401	5401	CAAATGACAC TGATAAAGTA GATTATGAAG AATACTCCAC AGAGTTGATT	5450
F-PTG17401	5451	GTAAATACAG ATAGTGAATC GACTATAGAC ATAATACTAT CTGGATCTAC	5500
F-PTG17401	5501	ACATTACCCG GAACTAGTT CTGAGAAACC TGATTATATA GATAATTCTA	5550
F-PTG17401	5551	ATTGCTCGTC GGTATTCGAA ATOGCGACTC CGGAACCAAT TACTGATAAT	5600
F-PTG17401	5601	GTAGAAGATC ATACAGACAC CGTCACATAC ACTAGTGATA GCATTAATAC	5650
F-PTG17401	5651	AGTAAGTGCA TCATCTGGAG AATCCACAAC AGACGAGACT CCGGAACCAA	5700
F-PTG17401	5701	TTACTGATAA AGAAGAAGAT CATAACAGTTA CAGACACTGT CTCATACACT	5750
F-PTG17401	5751	ACAGTAAGTA CATCATCTGG AATTGTCACT ACTAAATCAA CCACCGATGA	5800
F-PTG17401	5801	TGCGGATCTT TATGATACGT ACAATGATAA TGATACAGTA CCATCAACTA	5850
F-PTG17401	5851	CTGTAGGCGG TAGTACAACC TCTATTAGCA ATTATAAAAC CAAGGACTTT	5900
F-PTG17401	5901	GTAGAAATAT TTGGTATTAC CGCATTAATT ATATTGTCGG CCGTGGCAAT	5950
F-PTG17401	5951	ATTCTGTATT ACATATTATA TATATAATAA ACGTTCACGT AAATACAAAG	6000

FIG.3 (Fin)

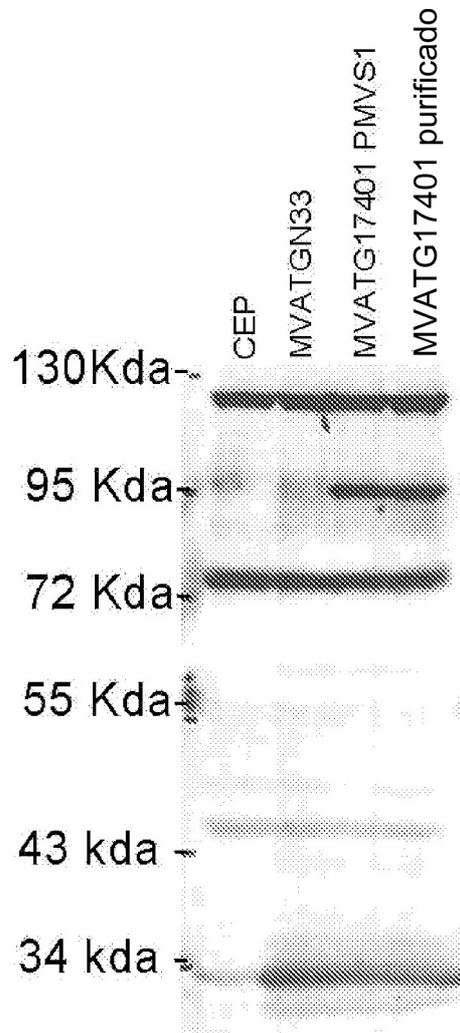


FIG.4

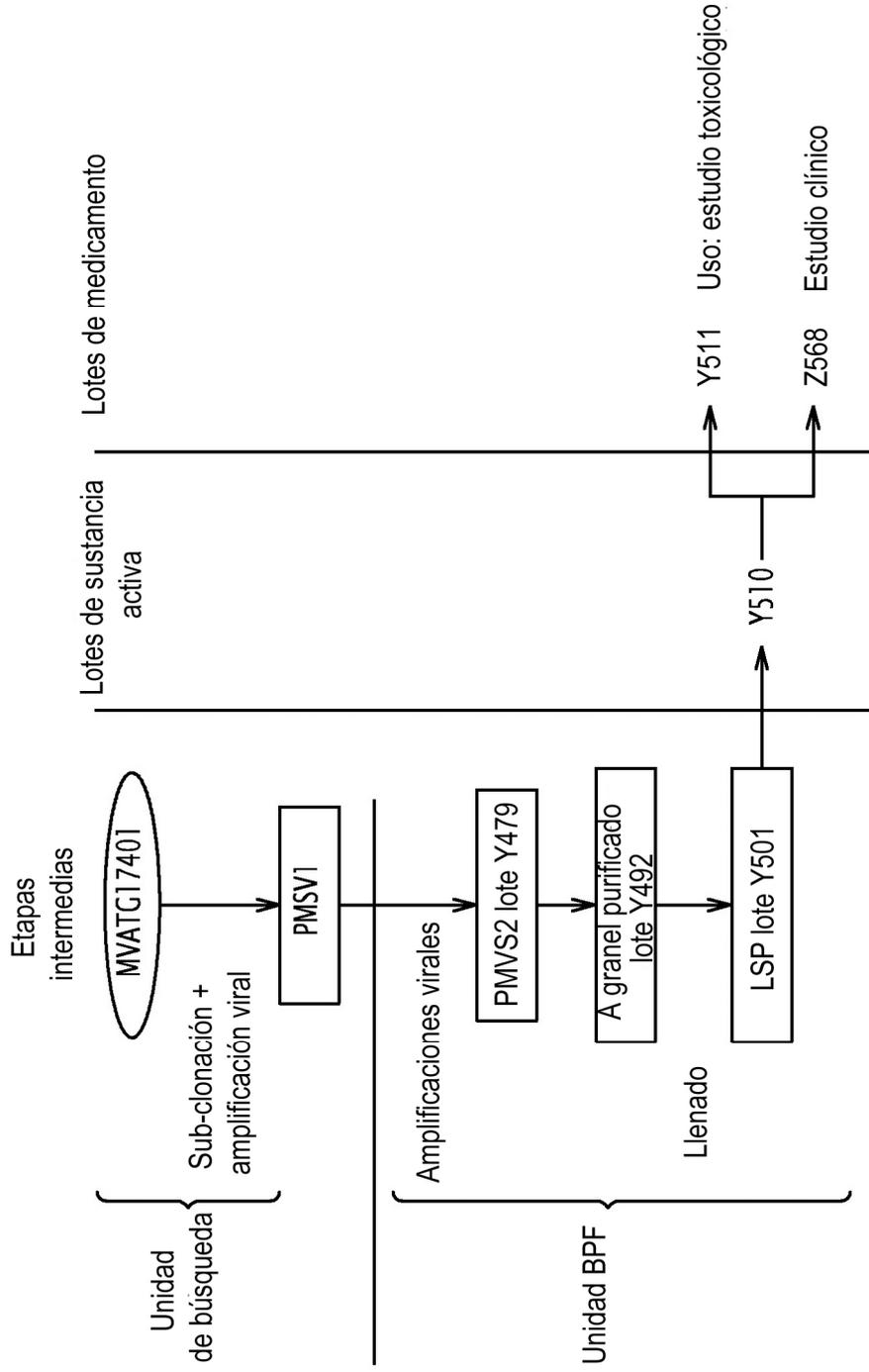


FIG.5