

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 820**

51 Int. Cl.:

C12N 15/867 (2006.01)

C07K 14/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2012** **PCT/IB2012/002363**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013** **WO13046034**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2012** **E 12813090 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018** **EP 2761011**

54 Título: **Uso de proteínas GAG no de subtipo B para encapsidación lentiviral**

30 Prioridad:

26.09.2011 EP 11306222

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

28.09.2018

73 Titular/es:

THERAVECTYS (50.0%)
1 mail du Professeur Georges Mathé
94800 Villejuif, FR y
INSTITUT PASTEUR (50.0%)

72 Inventor/es:

TRAN, THI-LAN;
CHARNEAU, PIERRE y
BAUCHE, CECILE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 683 820 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

Uso de proteínas GAG no de subtipo B para encapsidación lentiviral

Antecedentes de la invención

Se han desarrollado vacunas recombinantes con el progreso de la tecnología de ADN recombinante, que permiten la modificación de genomas virales para producir virus modificados. De este modo, ha sido posible introducir secuencias genéticas en patógenos no virales, de manera que codifiquen proteínas inmunogénicas que se van a expresar en células diana tras la infección, con el fin de desarrollar una respuesta inmunitaria específica en su hospedador.

Dichas vacunas constituyen un avance importante en la tecnología de las vacunas (Kutzler et al., Nat Rev Genet, 9(10) : 776-788, 2008). En particular, tienen la ventaja con respecto a las vacunas tradicionales de evitar virus vivos (atenuados) y eliminar riesgos asociados con la fabricación de vacunas inactivadas.

La administración génica usando retrovirus modificados (vectores retrovirales) se introdujo a principios de los años 80 por Mann et al. (Cell, 33(1): 153-9, 1983). Los vectores retrovirales oncogénicos más comúnmente usados se basan en el virus de la leucemia murina de Moloney (MLV). Tienen un genoma simple del que se producen las poliproteínas Gag, Pol y Env y se requieren en *trans* para la replicación viral (Breckpot et al., 2007, Gene Ther, 14(11):847-62; He et al. 2007, Expert Rev vaccines, 6(6):913-24). Las secuencias generalmente requeridas en *cis* son las repeticiones terminales largas (LTR) y su proximidad: las repeticiones invertidas (IR o sitios att) requeridas para integración, la secuencia de encapsidación Ψ , el sitio de unión a ARN de transporte (sitio de unión a cebador, PBS) y algunas secuencias adicionales implicadas en la transcripción inversa (la repetición R dentro de LTR, y los tramos de polipurina, PPT, necesarios para la iniciación de la hebra más). Para generar vectores retrovirales defectuosos en la replicación, los genes *gag*, *pol* y *env* se deletan generalmente completamente y se sustituyen con un casete de expresión.

Han surgido vectores retrovirales que derivan de genomas de lentivirus (es decir, vectores lentivirales) como herramientas prometedoras para tanto terapia génica como fines de inmunoterapia, debido a que presentan varias ventajas con respecto a otros sistemas virales. En particular, los propios vectores lentivirales son no tóxicos y, a diferencia de otros retrovirus, los lentivirus pueden transducir células no divisorias, en particular células dendríticas (He et al. 2007, Expert Rev vaccines, 6(6):913-24), que permiten la presentación de antígeno mediante la vía endógena.

Los lentivirus representan un género de virus lentos de la familia *Retroviridae*, que incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la inmunodeficiencia simia (VIS), el virus de la encefalitis equina infecciosa (VEEI), el virus de la artritis y encefalitis caprina (VAEC), el virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB) y el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF). Los lentivirus pueden persistir indefinidamente en sus hospedadores y se replican continuamente a tasas variables durante el transcurso de la infección de por vida. La replicación persistente de los virus en sus hospedadores depende de su capacidad para eludir las defensas del hospedador.

El diseño de vectores lentivirales recombinantes se basa en la separación de las secuencias de acción en *cis* y *trans* del lentivirus. La eficiente integración y replicación en células no divisorias requiere la presencia de dos secuencias de acción en *cis* en el genoma lentiviral, el tramo de polipurina central (cPPT) y la secuencia terminal central (CTS). Éstos conducen a la formación de una estructura de ADN de triple hebra denominada la "solapa" de ADN central, que maximiza la eficiencia de la importación génica en los núcleos de células no divisorias, que incluyen células dendríticas (DC) (Zennou et al., 2000, Cell, 101(2) 173-85; Arhel et al., 2007, EMBO J, 26(12):3025-37).

Se han generado vectores lentivirales de VIH-1 basándose en proporcionar las proteínas Gag, Pol, Tat y Rev de subtipo B para los vectores de encapsidación en *trans* a partir de una construcción de encapsidación (Naldini et al, PNAS 15: 11382-8 (1996); Zufferey et al, Nature Biotechnology 15:871-875, 1997); Dull et al, Journal of Virology (1997)). Estos estudios se realizaron con proteínas Gag y Pol de subtipo B. No se evaluó el efecto de las secuencias de *gag* y *pol* no de subtipo B en una construcción de encapsidación de VIH-1.

Existen muchos subtipos de VIH-1 diferentes distintos del subtipo B. Parece que algunos subtipos de VIH-1, tales como C, E y A, se transmiten más eficientemente que el subtipo B de VIH-1, que es el principal subtipo en los Estados Unidos y Europa. Essex et al., Adv Virus Res. 1999; 53:71-88. El subtipo predominante de VIH-1 que se encuentra en los países industrializados desarrollados, clado B, se diferencia considerablemente de los subtipos y recombinantes que existen en África y Asia, donde residen la gran mayoría de las personas infectadas por el VIH. Spira et al., J. Antimicrobial Chemotherapy (2003) 51, 229-240. Así, pueden existir graves discrepancias entre el retrovirus de subtipo B encontrado en América del Norte y Europa, los subtipos virales que asolan la humanidad a escala global. *Id.* La diversidad de subtipos puede afectar los modos de transmisión del VIH. La homosexualidad y el abuso de fármacos intravenosos son los modos primarios de transmisión observados para las cepas de clado B en Europa y América. *Id.* A diferencia, los clados A, C, D y E predominan en África y Asia donde predomina la transmisión heterosexual. *Id.* Además, algunos estudios sugieren que la progresión del SIDA se diferencia en función del subtipo infectante. *Id.* Así, parece que el subtipo B de VIH-1 es bastante diferente de los otros subtipos de VIH-1.

Las clasificaciones filogenéticas del VIH normalmente se basan en o bien las secuencias de nucleótidos derivadas de múltiples regiones subgenómicas (*gag*, *pol* y *env*) de las mismas cepas aisladas, o en el análisis de secuencias genómicas de longitud completa. Un análisis filogenético de secuencias de longitud casi completa del VIH-1 reveló que el subtipo B de VIH-1 estaba muy estrechamente relacionado genéticamente con el subtipo D de VIH (Figura 1).

5 Los análisis filogenéticos de las secuencias de proteínas Gag y Pol de VIH-1 también mostraron que el subtipo B de VIH-1 estaba muy estrechamente relacionado genéticamente con el subtipo D de VIH (Figura 2).

Sin embargo, VIH-1-NDK, un virus de subtipo D, es significativamente más citopático para linfocitos CD4+ que el prototipo VIH-1-BRU, un virus de subtipo B. Esto puede ser debido a las potenciadas fusogenicidad e infectividad de los virus de subtipo D. De Mareuil et al., J. Virol. 66: 6797 (1992). El análisis fenotípico de virus recombinantes indicó

10 que los 75 aminoácidos desde la parte del extremo N de la proteína de matriz de VIH-1-NDK (MA), junto con la glucoproteína de la envuelta de VIH-1-NDK, son responsables de la potenciada fusogenicidad de VIH-1-NDK en linfocitos CD4+, así como de la potenciada infectividad de VIH-1-NDK en algunas líneas celulares CD4. *Id.*

Existe una necesidad en la materia de construcciones de encapsidación lentiviral que produzcan mayores títulos de vectores lentivirales encapsidados, con el fin de reducir los volúmenes de inyección, aumentar las dosificaciones,

15 reducir el coste de vacunación y aumentar el número de pacientes que se podrían tratar con un lote. La actual invención cumple esta necesidad.

Breve resumen de la invención

Se substituyó el gen *gag-pol* de subtipo B de VIH-1 en un plásmido de encapsidación lentiviral (construcción p8.74) por el gen *gag-pol* de un VIH-1 de subtipo D para generar la construcción pThV-GP-N. Las construcciones se usaron

20 para la producción de vectores lentivirales. Se obtuvieron títulos aproximadamente 2 veces mayores usando el plásmido pThV-GP-N en comparación con la construcción p8.74. Así, Gag-Pol de un virus de subtipo D aumenta el título de partículas de vector lentiviral con respecto a Gag-Pol de un virus de subtipo B.

El texto describe un vector de encapsidación lentiviral que comprende una secuencia de *gag-pol* de subtipo D, particularmente de VIH-1 NDK. En una realización preferida, el vector de encapsidación lentiviral comprende la

25 secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

La presente invención se refiere a un vector de encapsidación lentiviral defectuoso en la replicación que no codifica una Env de VIH-1 funcional y que carece de un sitio Ψ y que codifica Gag-Pol de VIH-1 seleccionada del grupo que consiste en Gag-Pol de VIH-1 de VIH-1 NDK o Gag-Pol de VIH-1 de un VIH-1 de subtipo D, caracterizada por que la

30 proteína Gag-Pol comprende una porción de proteína MA que tiene una o más de las siguientes características:

la ausencia de un ácido glutámico en la posición de aminoácido 12;

la ausencia de una arginina en la posición de aminoácido 15;

la ausencia de una valina en la posición de aminoácido 46; y

la ausencia de una leucina en la posición de aminoácido 61, en la que las posiciones de aminoácidos se numeran con respecto a SEQ ID NO: 5.

35 En una realización particular, la proteína Gag-Pol de VIH-1 es una proteína Gag-Pol de VIH-1 de VIH-1 NDK. En una realización preferida, el vector de encapsidación lentiviral codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 1 es:

atgggtgcgagagcgtcagtattaagcgggggaaaattagatacatgggaaagaattcgggttac
ggccaggaggaaagaaaaaatatgcactaaaacatttgatatgggcaagcaggagctagaacg
atttacacttaatcctggccttttagagacatcagaaggctgtaaacaaataataggacagcta
caaccatctattcaaacaggatcagaagaaattagatcattatataatacagtagcaaccctct
attgtgtacatgaaaggatagaggtaaaagacaccaaagaagctgtagaaaagatggaggaaga
acaaaacaaaagtaagaaaaagacacagcaagcagcagctgatagcagccagggtcagccaaaat
taccctatagtgcagaacctacaggggcaaattggtacatcaggccatatcacctagaactttga
acgcatgggtaaaagtaatagaagaaaaggccttcagcccgaagtaatacccatgttttcagc
attatcagaaggagccaccccacaagattttaaacaccatgctaaacacagtggggggacatcaa
gcagctatgcaaattgctaaaagagaccatcaatgacgaagctgcagaatgggacagattacatc
cagtgcagcagggcctgttgccaccaggccaaatgagagaaccaaggggaagtgatatagcagg
aactactagtacccttcaggaacaaatagcatggatgacaagcaaccacctatcccagtagga
gaaatctataaaaagatggataatcctgggattaaataaaaatagtaagaatgtatagccctgtca
gcatttttgacataagacagggaccacaaaggaaccttttagagactatgtagaccgggtctataa
aactctaagagccgagcaagcttcacaggatgtaaaaaactggatgacagaaacctgttggtc
caaatgcaaaccagattgtaaaactatcttaaaagcattgggaccacaggctacactagaag
aatgatgacagcatgccaggagtggtggggggcccgccataaagcaagagttttggctgaggc
aatgagccaagtaacaggttcagctactgcagtaatgatgcagagaggcaattttaaggggcca
agaaaaagtattaagtgtttcaactgtggcaaggaagggcacacagcaaaaaattgcagggccc
ctagaaaaaagggtgttggaatgcggaagggaaggacaccaaataagaaagattgcactgaaag
acaggctaatttttttagggaagatttgcccttcccacaagggaaggccggggaattttcttcag
agcagaccagagccaacagccccaccagcagagagcttcgggtttggggaggagataacccctc
ctcagaaacaggagcagaaagacaaggaactgtatccttttagcttccctcaaatacactctttgg
caacgacccctcgtcacataaagatagggggacagctaaaggaagctctattagatacaggag
cagatgatacagtattagaagaaataaatttgccaggaaaatggaagccaaaatgataggggg
aattggagggttttatcaaagtaagacagtatgatcaaatactcatagaaatctgtggatataaa
gctatgggtacagtattagtaggacctacacctgtcaacataattggaagaaatttggtgacct

agattggctgcactctaaattttccaattagtcctattgaaactgtaccagtaaaattaaagcc
 aggaatggatggcccaaaagttaacaatggccattgacgaagaaaaataaaagcattaacag
 aaatttgtacagaaatggaaaaggaaggaaaaatttcaagaattgggcctgaaaatccatataa
 tactccaatatttggcataaaagaaaaagacagtagccaagtggagaaaattagtagatttcaga
 gaacttaataagagaactcaagattttctgggagggttcaattaggaataccgcctcctgcagggc
 tgaaaaagaaaaatcagtaacagtagctggatgtgggtgatgcataattttctcagttcccttaga
 tgaagatttttaggaaatataccgcattttaccatacctagtataaacaatgagacaccagggatt
 agatatcagtagaactgtgtctccacagggatggaaaggatcacgggaatattccaaagtagca
 tgacaaaaatcttagagccctttagaaaacaaaatccagaaatagttatctatcaatacatggga
 tgatttgtatgtaggatctgacttagaaatagggcagcatagaacaaaaatagaggaattaaga
 gaacatctattgaggtggggattttaccacaccagataaaaaacatcagaaagaacctccatttc
 tttggatgggttatgaactccatcctgataaaggacagtagacgctataaacctgccagaaaa
 agaaagctggactgtcaatgatatacagaagttagtggggaaattaaactgggcaagccagatt
 tatgcaggaattaaagtaagcaattatgtaaactccttaggggaaccaaagcactaacagaaq
 tagtaccactaacagaagaagcagaattagaactggcagaaaaacagggaaattctaaaaagaacc
 agtacatggagtgtattatgacccatcaaaagacttaatagcagaactacagaaacaaggggac
 ggccaatggacataccaaaatttatcaagaaccattttaaaaaatctaaaaacagggaagtagcaa
 gaacgaggggtgcccacactaatgatgtaaaaacaattaacagaggcagtgcaaaaatagccac
 agaaagcatagtgtatgtgggaaagactcctaaattttaaactaccatacaaaaggaaacatgg
 gaaacatggtggatagagtattggcaagccacctggattcctgagtgggaatttgtcaataccc
 ctcttttagtaaaaattatggtaccagttagagaaggaaccataataggagcagaaactttcta
 tgtagatggggcagctaataagagagactaaattaggaaaagcaggatattgttactgacagagga
 agacagaaagtgtccttttcaactgacacgacaaaatcagaagactgagttacaagcaattaatc
 lagctllacaggallcgggallagaaglaaacataglaacagallcacaalalgacactaggaal
 cattcaagcacaaccagataagagtgtaatcagagtttagtcagtcataataatagagcagctaata
 aaaaaggaaaggtttacctggcatgggtaccagcacacaaaaggaattggagggaatgaaacag
 tagataaattagtcagtcagggaatcaggaaagtactattttggatggaatagataaggctca
 ggaagaacatgagaaatatcacaacaattggagagcaatggctagtgtattttaacctaccacct
 gtggtagcgaaagaaatagtagctagctgtgtataaatgtcagctaaaaggagaagccatgcatg
 gacaagtagactgtagtccaggaatatggcaattagattgtacacatctggaaggaaaagttat
 cctggtagcagttcatgtagccagtggttatatagaagcagaagttattccagcagaaacgggg
 caagaaacagcatactttctcttaaaattagcaggaagatggccagtaaaagtagtacatacag
 ataattggcagcaatttcaccagtgctacaggttaaggccgcctgttggtgggcagggatcaaca
 ggaatttgggaattccctacaatccccaagtcaggagtagtagaattctatgaataaagaatta
 aagaaaattataggacaggttaagagatcaagctgaacatcttaagacagcagtagacaaatggcag
 tattttatccacaatttttaaaagaaaaggggggattgggggatacagtgaggggaaagaataat
 agacataatagcaacagacatacaaaactagagaattacaaaaacaaatcataaaaattcaaaat
 tttcgggtttattacagggacagcagagatccaatttggaaaggaccagcaaaagcttctctgga
 aaggtgaaggggcagtagtaatacaagacaatagtgacataaaggtagtaccagaagaaaagt
 aaagatcattagggattatggaaaacagatggcaggtgatgattgtgtggcaagtagacaggat
 gaggattaac (SEQ ID NO 1).

La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 2 es:

MGARASVLSGGKLD AWERIRLRPGGKKKYALKHLI WASRELERIALNPGLLETSEGCK
 QIIGQLQPSIQTGSEELRSLYNTIATLYCVHERIEVKDTKEAVEKMEEEQNKSKKKTQQ
 AAADSSQVSQNYPIVQNLQGQMVHQAI SPRTLNAWVKVIEEKA FSPEVIMFSA LSEG
 ATPQDLNTMLNTVG GHQAAMQMLKETINDEAAEWDR LHPVHAGPVAPGQMREPRG
 SDIAGTTSTLQE QIAWMTSNPPIPVGEIYKRWILGLNKIVRMYS PVSILDIRQGPKEPFR
 DYVDRFYKTLRAEQASQDVKNWMTETLLVQNaNPDCKTILKALGPQATLEEMMTACQ
 GVGGPGHKARVLAEAMSQVTGSVTAVMMQRGNFKGPRKSIKCFNCGKEGHTAKNC
 RAPRKKG CWKCGREGHQMKDCSERQANFLGKIWPSHKGRPGNFLQSRPEPTAPPA
 ESFGFGEEITPSQKQE QKDKELYPLASLKS LFGNDPSSQFFREDLAFPQGKAGEFSSE
 QTRANSPTSREL RVWGGDNPLSETGAEGQGTVSFSFPQITLWQRPLVTIKIGGQLKEA
 LLDTGADDTVLEEMNLP GKWKPKMIGGIGGFIKVRQYDQILIEICGYKAMGTVLVGPTP
 VNIIGRNLLTQIGCTLNFPISPIETVPVKLKP GMDGPKVKQWPLTEEKIKALTEICTEMEK
 EGKISRIGPENPYNTPIFAIKKKDSTKWRKLVD FRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKK
 KKS VTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQG WKGSPAIFQ
 SSMTKILEPFRKQNPEIVYQYMDDL YVGS DLEIGQHRTKIEELREHLLRWGFTTPDKK
 HQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIKLPEKESWTVNDIQKLVGKLNWASQIYAGIKVK
 QLCKLLRGTKALTEVVPLTEEA ELELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAELQKQGDGQ
 WTYQIQEPFKNLKTGKYARTRGAHTNDVKQLTEAVQKIATESIWIWGKTPKFKLPIQK
 ETWETWWIEYWQATWIPEWEFVNTPLVKLWYQLEKEPIIGAETFYVDGAANRETKL
 GKAGYVTDRGRQKVVPFTDTTNQKTELQAINLALQDSGLEVNIVTDSQYALGIIQAQPD
 KSESELVSQII EQLIKKEKVYLAWVPAHKGIGGNEQVDKLV SQGIRKVLFLDGIDKAQEE
 HEKYHNNWRAMASDFNLPPVVAKEIVASCDKCQLKGEAMHGQVDCSPGIWQLDCTH
 LEGKVLVAVHVASGYIEAEVIPAETGQETAYFLLKLAGRWPVKVHTDNGSNFTSATV
 KAACWWAGIKQEF GIPYNPQSQGVVESMNKELKKIIGQVRDQAEHLKTAVQMAVFIHN
 FKRKGIGGYSAGERIIDIIATDIQTRELQKQIIKIQNFRVYYRDSRDP IWKGPALLWK
 EGAVVIQDNSDIKVVP RRKVKIIRDY GKQMAGDDCVASRQDED (SEQ ID NO:2).

El texto describe un vector de encapsidación lentiviral que comprende una secuencia de MA de subtipo D, particularmente de VIH-1 NDK. En una realización preferida, el vector de encapsidación lentiviral codifica una proteína MA que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

La secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 3 es:

MGARASVLSGGKLD TWERIRLRPGGKKKYALKHLI WASRELERFTLNPGLLETSEGCK
 QIIGQLQPSIQTGSEELRSLYNTVATLYCVHERIEVKDTKEAVEKMEEEQNKSKKKTQQ
 AAADSSQVSQNY (SEQ ID NO 3).

Preferentemente, el vector de encapsidación lentiviral que codifica la proteína Gag MA de VIH genera al menos un aumento de 1,5 veces, o al menos un aumento de 2 veces, en el título de un vector lentiviral encapsidado en comparación con el vector de encapsidación lentiviral que codifica una proteína Gag MA de VIH de VIH-1 BRU, por ejemplo, p8.74. Preferentemente, el vector de encapsidación lentiviral es defectuoso en la replicación y carece de un sitio Ψ .

En una realización preferida, el vector de encapsidación lentiviral codifica una proteína Gag MA de VIH que tiene un aminoácido en la posición 12 que no es un ácido glutámico y un aminoácido en la posición 15 que no es una

arginina. Preferentemente, el vector de encapsidación lentiviral no tiene ni una valina en la posición 46 ni una leucina en la posición 61.

En una realización preferida, el aminoácido en la posición 12 de la proteína MA es una lisina. En una realización preferida, el aminoácido en la posición 15 es una treonina. En una realización preferida, el aminoácido en la posición 15 es una alanina. En una realización preferida, el aminoácido en la posición 46 es una leucina. En una realización preferida, el aminoácido en la posición 61 es una isoleucina. En una realización preferida, el aminoácido en la posición 61 es una metionina.

En una realización, el vector no codifica una proteína Env funcional.

La invención también engloba métodos de preparación de los vectores de encapsidación lentiviral anteriores y métodos de uso de estos vectores de encapsidación lentiviral.

En particular, la presente invención se refiere a un método de generación de un vector de encapsidación lentiviral defectuoso en la replicación de la invención, comprendiendo el método insertar una secuencia de nucleótidos que codifica Gag-Pol de VIH-1 según la invención, respectivamente, en un plásmido bajo el control de un promotor no del VIH para generar el vector de encapsidación.

La presente invención también se refiere a un método *in vitro* de generación de una partícula de vector lentiviral, comprendiendo el método administrar un vector de encapsidación según la invención a una célula con un vector lentiviral.

Breve descripción de los dibujos

La invención se entiende más completamente mediante referencia a los dibujos.

La Fig. 1 representa árboles filogenéticos del virus VIH.

Las Fig. 2A y B representan árboles filogenéticos de las proteínas GAG (A) y POL (B) del VIH.

Las secuencias de las proteínas GAG y POL se obtuvieron de: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/NEALIGN/align.html>. Para cada clado de VIH conocido, se eligieron aleatoriamente secuencias de virus de un paciente (para el clado B) o de dos pacientes y se compararon las secuencias de las proteínas GAG y POL con las proteínas de clado B de referencia (B.FR.83.HXB2_LAI_IIIB_BRU.K03455). Los alineamientos se realizaron usando Vector NTI advance 11 (Invitrogen).

La Fig. 3 representa títulos obtenidos usando los plásmidos p8.74 y pThV-GP-N para la producción de vectores. Se produjeron partículas lentivirales usando el plásmido proviral (pFLAP-CMV-GFP), el plásmido de pseudotipificación (pTHV-VEV.G) y cualquiera de los plásmidos de encapsidación comúnmente usados (derivados de la cepa BRU, p8.74) o un plásmido de encapsidación derivado de NDK (pTHV-GP-N). Con cada plásmido de encapsidación, se realizaron 18 transfecciones independientes y se midieron los títulos de partículas por análisis de FACS. También se obtuvieron resultados similares usando un vector empleando un plásmido proviral que contenía el promotor de β 2-microglobulina que conduce la expresión del antígeno de VIH.

La Fig. 4 representa la producción de virus BRU y NDK no mutados y la evaluación de su eficiencia de fase temprana respectiva. Se transfectaron células 293T con o bien plásmido que codifica el virus BRU no mutado (pBRU) o virus NDK (pNDK-N). Se recogieron los sobrenadantes virales después de 48 horas y se diluyeron para infectar células P4-CCR5 (que engloban un gen indicador de luciferasa estable cuya expresión es conducida por LTR de VIH, que permite una producción de luciferasa en presencia de la proteína TAT (llevada por el virus). Se usaron dilución sucesiva de cualquiera de los virus BRU o NDK para infectar células P4-CCR5 y se midieron la expresión de luciferasa (A) o la relación luciferasa/P24 (B).

La Fig. 5 representa la producción de vector usando diferentes relaciones de plásmidos de encapsidación derivados de BRU (p8.74) y NDK (pThV GP-N). Para cada una de las condiciones (desde 0 μ g de NDK + 10 μ g de BRU hasta 10 μ g de NDK + 0 μ g de BRU), se midieron el título (barras grises) y el nivel de P24 (cuadrados negros).

La Fig. 6 representa una transferencia Western de sobrenadantes de vector producidos usando cualquiera de los plásmidos de encapsidación derivados de BRU (8.74) o NDK (pThV GP-N). Se realizó la detección de la proteína P24 y precursores usando el MAB anti-P24 NIH (183-H12-5C).

La Fig. 7 representa un alineamiento de secuencias de las secuencias de MA del extremo N de un virus de clado B (BRU; SEQ ID NO: 3) con un virus de clado D (NDK; SEQ ID NO:4).

La Fig. 8 representa un alineamiento de secuencias de las secuencias de MA del extremo N del virus de clado B.

La Fig. 9 representa un alineamiento de secuencias de las secuencias de MA del extremo N del virus de clado D.

La Fig. 10 representa un alineamiento de secuencias de las secuencias de MA del extremo N de un virus de clado B (BRU) con virus de otros clados.

5 Descripción detallada de la invención

Los virus de VIH-1 de subtipo B se diferencian de otros subtipos de VIH-1 en que parece que los virus de subtipo B se transmiten menos eficientemente y tienen un modo de transmisión diferente. Sin embargo, se han usado ampliamente los virus de subtipo B en la generación de vectores lentivirales de VIH-1 y vectores de encapsidación lentiviral. Para determinar si las proteínas Gag y Pol de virus no de subtipo B se podrían usar para la generación de vectores de encapsidación lentiviral, se sustituyó el gen *gag-pol* del subtipo B de VIH-1 en un plásmido de encapsidación lentiviral (construcción p8.74) por el gen *gag-pol* de un VIH-1 de subtipo D para generar la construcción pThV-GP-N. Las construcciones se usaron para la producción de vectores lentivirales. Se obtuvieron títulos aproximadamente 2 veces mayores usando el plásmido pThV-GP-N en comparación con la construcción p8.74 (Figura 3). Así, Gag-Pol de VIH-1 de subtipo D en el vector de encapsidación aumentó el título de vector lentiviral con respecto al título observado con Gag-Pol de VIH-1 de subtipo B.

El elevado título del vector lentiviral es beneficioso en permitir la reducción de contaminantes en una dosis dada de vector lentiviral. Esto facilita una reducción de los volúmenes de inyección, y un aumento de posibles dosificaciones. Facilita además reducir el coste de vacunación, reduciendo la cantidad de materiales y trabajo necesarios para lograr una dosis particular, y aumentar el número de pacientes que se podrían tratar con un único lote de vector lentiviral.

Las diluciones sucesivas de los virus VIH-1 BRU y VIH-1 NDK indicaron que el virus VIH-1 NDK era más eficiente en las fases tempranas del ciclo de vida viral (Figura 4). Mezclando diferentes cantidades de los vectores de encapsidación de subtipo B y subtipo D se demostró que el vector de encapsidación de subtipo D aumentó tanto el título como el nivel de p24 en las preparaciones de vector lentiviral (Figura 5). También se observó que p24 en las preparaciones de vector lentiviral usando el vector de encapsidación de subtipo D se procesaba menos completamente, mostrando niveles más altos de precursores de p24 (Figura 6). Así, la proteína Gag en el vector de encapsidación de subtipo D presentó diversas diferencias de los vectores de encapsidación de subtipo B.

Se sabe que, con Env de VIH-1, los 75 aminoácidos de la parte del extremo N de la proteína de matriz (MA) de VIH-1-NDK son responsables de la potenciada fusogenicidad de VIH-1-NDK en linfocitos CD4+, así como de la potenciada infectividad de VIH-1-NDK en algunas líneas celulares CD4. De Mareuil et al., J. Virol. 66: 6797 (1992). Puesto que la proteína Env usada para la generación de vectores lentivirales con los vectores de encapsidación de subtipo B y subtipo D es la misma (es decir, VEV), solo están presentes las diferencias en MA de VIH-1 en los vectores de encapsidación de subtipo B y subtipo D.

Se examinó la conservación y divergencia de aminoácidos en los 75 aminoácidos del extremo N de M de diversos clados del virus VIH-1. VIH-1 NDK mostró 10 diferencias en los aminoácidos de VIH-1 BRU (Figura 7). Sin embargo, solo se observaron ocho de estas diferencias cuando VIH-1 NDK se comparó con una selección de 20 virus VIH-1 de subtipo B diferentes (Figura 8). Cuando se incluyeron otros virus de subtipo D en la comparación, solo permanecieron 4 de estas diferencias (Figura 9). Estas diferencias son la ausencia de un ácido glutámico en la posición de aminoácido 12, la ausencia de una arginina en la posición de aminoácido 15, la ausencia de una valina en la posición de aminoácido 46 y la ausencia de una leucina en la posición de aminoácido 61 en los virus de subtipo D.

Cuando se incluyeron otros virus de subtipo en la comparación, pareció que los otros subtipos se alinearon con el subtipo D, conservando casi todas estas diferencias (Figura 10). Casi todos los virus no de subtipo B presentaron una lisina en la posición 12. Muchos de los virus no de subtipo B presentaron una alanina en la posición 15. Casi todos los virus no de subtipo B presentaron una leucina en la posición 46. Casi todos los virus no de subtipo B presentaron una metionina o isoleucina en la posición 61. Los virus no de subtipo B presentaron el consenso de una lisina en la posición 12, un aminoácido distinto de arginina en la posición 15, una leucina en la posición 46 y una isoleucina o metionina en la posición 61.

El texto describe vectores de encapsidación que codifican proteínas Gag y/o Pol no de subtipo B y células hospedadoras que comprenden estos vectores. El texto describe además métodos de preparación de vectores de encapsidación que codifican proteínas Gag y/o Pol no de subtipo B. El texto también describe métodos de uso de estos vectores de encapsidación para generar vectores lentivirales, y vectores lentivirales que comprenden proteínas Gag y/o Pol no de subtipo B.

Vectores de encapsidación

El texto describe vectores de encapsidación que codifican proteínas Gag y/o Pol no de subtipo B. Un "vector de encapsidación" lentiviral se define en el presente documento como una secuencia de ácidos nucleicos que no codifica Env de VIH-1 funcional y que carece de un sitio Ψ , pero capaz de expresar proteínas Gag y/o Pol lentivirales

que se pueden incorporar en partículas virales cuando se cotransfectan con un vector que contiene señales lentivirales apropiadas que actúan en cis para la encapsidación. El vector de encapsidación lentiviral de la invención es incapaz de replicarse él mismo por encapsidación e invertir la transcripción de su propia secuencia.

5 El vector de encapsidación puede ser un vector de ARN o ADN. Las proteínas Gag y Pol no de subtipo B se pueden seleccionar de proteínas de subtipo A, subtipo C, subtipo D, subtipo E, subtipo F1, subtipo F2, subtipo G, subtipo H, y subtipo J, y recombinantes de las mismas. Un vector de encapsidación preferido comprende SEQ ID NO: 1 o codifica SEQ ID NO: 2.

10 El texto describe vectores de encapsidación que codifican proteínas Gag no de subtipo B y células hospedadoras que comprenden estos vectores. Las proteínas Gag no de subtipo B se pueden seleccionar de proteínas de subtipo A, subtipo C, subtipo D, subtipo E, subtipo F1, subtipo F2, subtipo G, subtipo H y subtipo J, y recombinantes de las mismas. Más particularmente, la presente invención se refiere a un vector de encapsidación lentiviral defectuoso en la replicación que no codifica una Env de VIH-1 funcional y que carece de un sitio Ψ y que codifica Gag-Pol de VIH-1 seleccionado del grupo que consiste en Gag-Pol de VIH-1 de VIH-1 NDK o Gal-Pol de VIH-1 de un VIH-1 de subtipo D, caracterizado por que la proteína Gag-Pol comprende una porción de proteína MA que tiene una o más de las

15 siguientes características:

la ausencia de un ácido glutámico en la posición de aminoácido 12;

la ausencia de una arginina en la posición de aminoácido 15;

la ausencia de una valina en la posición de aminoácido 46; y

20 la ausencia de una leucina en la posición de aminoácido 61, en la que las posiciones de aminoácidos se numeran con respecto a SEQ ID NO: 5.

Un vector de encapsidación preferido codifica la porción de proteína Gag de SEQ ID NO: 2.

25 El texto describe vectores de encapsidación que codifican proteínas MA no de subtipo B y células hospedadoras que comprenden estos vectores. Las proteínas MA no de subtipo B se pueden seleccionar de proteínas de subtipo A, subtipo C, subtipo D, subtipo E, subtipo F1, subtipo F2, subtipo G, subtipo H y subtipo J, y recombinantes de las mismas. Un vector de encapsidación preferido codifica SEQ ID NO: 3 o la porción de proteína MA de SEQ ID NO: 2.

En diversas realizaciones, el vector de encapsidación comprende SEQ ID NO: 1 o una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a SEQ ID NO: 1. En diversas realizaciones, el vector de encapsidación codifica SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

30 Como se usa en el presente documento, el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácidos nucleicos se puede determinar comparando la información de secuencias usando el programa informático GAP, versión 6.0, descrito por Devereux et al. (Nucl. Acids Res. 12:387, 1984) y disponible de University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG), usando los parámetros por defecto para el programa GAP que incluyen: (1) una matriz de comparación unaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no identidades) para nucleótidos, y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y Burgess, Nucl. Acids Res. 14:6745, 1986, como se describe por Schwartz y Dayhoff, eds., Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358, 1979; (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización de 0,10 adicional para cada símbolo en cada hueco; y (3) ninguna penalización para huecos terminales.

35

40 El vector comprende una secuencia que codifica una proteína MA de VIH-1 que tiene una o más de las siguientes características:

la ausencia de un ácido glutámico en la posición de aminoácido 12;

la ausencia de una arginina en la posición de aminoácido 15;

la ausencia de una valina en la posición de aminoácido 46; y

la ausencia de una leucina en la posición de aminoácido 61.

45 En diversas realizaciones, el vector comprende una secuencia que codifica una proteína MA de VIH-1 que tiene una o más de las siguientes características:

el aminoácido en la posición 12 es una lisina;

el aminoácido en la posición 15 es una treonina;

el aminoácido en la posición 15 es una alanina;

50 el aminoácido en la posición 46 es una leucina;

el aminoácido en la posición 61 es una isoleucina; y/o

el aminoácido en la posición 61 es una metionina.

El vector de encapsidación codifica Gag y Pol de VIH-1. Más preferentemente, el vector de encapsidación codifica una proteína Gag MA de VIH-1.

5 El vector de encapsidación puede contener secuencias virales o no virales para la expresión de Gag y Pol. El vector de encapsidación puede contener una LTR de VIH-1 o la región U3 de una LTR de VIH-1. En otras realizaciones, el vector de encapsidación no contiene LTR de VIH-1. Se puede usar cualquier promotor para conducir la expresión de Gag y Pol. Preferentemente, el promotor es un promotor fuerte en células humanas. Más preferentemente, el vector de encapsidación contiene un promotor de citomegalovirus (CMV), un potenciador temprano del CMV / promotor de β -actina de pollo (CAG), un promotor del virus del sarcoma de Rous (VSR), un promotor de fosfoglicerato cinasa humana (hPGK), o una U3 de un promotor de LTR (por ejemplo, U3 de virus del sarcoma mieloproliferativo (VSMP)) que conduce la expresión de los genes codificados, por ejemplo *gag* y *pol*.

10 Preferentemente, el vector de encapsidación contiene una señal de poliadenilación. Puede ser cualquier señal de poliadenilación. Preferentemente, la señal de poliadenilación es una señal fuerte en células humanas. Más preferentemente, la señal de poliadenilación es una α 2-globina humana o una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH).

15 Preferentemente, el vector de encapsidación contiene un elemento sensible a Rev (RRE). En una realización preferida, el vector de encapsidación expresa una proteína Rev de VIH-1. En una realización preferida, el vector de encapsidación contiene al menos un sitio donante de corte y empalme y al menos un sitio aceptor de corte y empalme. En una realización, el vector de encapsidación expresa una proteína Tat de VIH-1.

20 En realizaciones preferidas, el vector de encapsidación carece de secuencias que codifican Vif, Vpr, Vpu y/o Nef de VIH-1. El vector de encapsidación puede comprender una secuencia que codifica una proteína MA de VIH-1 que tiene una o más de las características tratadas en el presente documento.

25 El texto menciona una realización donde el vector de encapsidación codifica solo 1 proteína de VIH-1, Gag. En una realización, el vector de encapsidación codifica solo 2 proteínas de VIH-1, Gag y Pol. En una realización, el vector de encapsidación codifica solo 3 proteínas de VIH-1, seleccionadas de Gag, Pol, Rev y Tat. En una realización, el vector de encapsidación codifica solo 4 proteínas de VIH-1, Gag, Pol, Rev y Tat.

30 En una realización, el vector comprende (desde 5' hasta 3') un promotor del CMV, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica Gag-Pol de VIH-1, un exón que codifica parte de Tat y Rev, un sitio donante de corte y empalme, un intrón que contiene un RRE, un sitio aceptor de corte y empalme, un exón que codifica parte de Tat y Rev, y una señal de poliadenilación. Gag-Pol de VIH-1 es una Gag-Pol de VIH-1 de subtipo D.

El vector de encapsidación puede contener además un origen for replicación en bacterias o células eucariotas. El vector de encapsidación puede contener un gen marcador de selección para la selección en bacterias o células eucariotas.

35 El texto describe células hospedadoras que comprenden los vectores de encapsidación de la invención. Las células hospedadoras se pueden transfectar transitoriamente con los vectores de encapsidación de la invención. En particular, la presente invención se refiere a una célula aislada que comprende el vector de encapsidación lentiviral defectuoso en la replicación de la invención. En una realización particular, el vector se integra establemente en el genoma de la célula. Las células hospedadoras pueden ser líneas celulares con los vectores de encapsidación de la invención integrados en el genoma de la célula hospedadora. Muchas células diferentes son células hospedadoras adecuadas. Preferentemente, las células son células humanas, más preferentemente una línea celular humana inmortalizada. En una realización, las células son células HEK 293T. En una realización, las células son células HeLa, HT1080 o PER C6 (Delenda et al, Cells for Gene Therapy and vector Production, from Methods in Biotechnology, Vol 24: Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols, 2ª Ed. Editado por R. Pörtner, Humana Press Inc., Totowa, NJ).

Sistemas de encapsidación

50 El texto describe sistemas de encapsidación lentiviral que comprenden células que expresan proteínas Gag y/o Pol no de subtipo B. Un "sistema de encapsidación" lentiviral se define en el presente documento como un sistema basado en células que comprende células que expresan al menos las proteínas Gag y Pol lentivirales en ausencia de un sitio Ψ , y capaces de encapsidación y transcripción inversa de un ácido nucleico exógeno que contiene un sitio Ψ . Las células del sistema de encapsidación lentiviral también pueden expresar otras proteínas virales. Preferentemente, el sistema de encapsidación lentiviral expresa una proteína de la envoltura. La proteína de la envoltura puede ser una proteína de la envoltura lentiviral (por ejemplo, Env de VIH-1) o no lentiviral (por ejemplo, VEV, virus Sindbis, virus de la rabia). En diversas realizaciones, el sistema de encapsidación lentiviral expresa una proteína Tat y/o Rev de VIH-1.

En diversas realizaciones, las células del sistema de encapsidación lentiviral contienen secuencias que codifican Gag y/o Pol de VIH-1 establemente integradas en su genoma. En diversas realizaciones, las células del sistema de encapsidación lentiviral contienen secuencias que codifican una proteína de la envoltura establemente integrada en su genoma. En diversas realizaciones, las células del sistema de encapsidación lentiviral contienen secuencias que

5 codifican Tat y/o Rev de VIH-1 establemente integradas en su genoma.

En diversas realizaciones, las células del sistema de encapsidación lentiviral expresan transitoriamente proteínas Gag y/o Pol de VIH-1. En diversas realizaciones, las células del sistema de encapsidación lentiviral expresan transitoriamente una proteína de la envoltura. En diversas realizaciones, las células del sistema de encapsidación lentiviral expresan transitoriamente proteínas Tat y/o Rev de VIH-1.

10 Las células del sistema de encapsidación lentiviral pueden expresar proteínas Gag y Pol no de subtipo B seleccionadas de proteínas de subtipo A, subtipo C, subtipo D, subtipo E, subtipo F1, subtipo F2, subtipo G, subtipo H y subtipo J, y recombinantes de las mismas. En una realización, las células del sistema de encapsidación lentiviral comprenden SEQ ID NO: 1 o expresan SEQ ID NO: 2.

15 En diversas realizaciones, las células del sistema de encapsidación lentiviral expresan proteínas Gag no de subtipo B. Las proteínas Gag no de subtipo B se pueden seleccionar de proteínas de subtipo A, subtipo C, subtipo D, subtipo E, subtipo F1, subtipo F2, subtipo G, subtipo H y subtipo J, y recombinantes de las mismas.

20 En diversas realizaciones, las células del sistema de encapsidación lentiviral expresan proteínas MA no de subtipo B. Las proteínas MA no de subtipo B se pueden seleccionar de proteínas de subtipo A, subtipo C, subtipo D, subtipo E, subtipo F1, subtipo F2, subtipo G, subtipo H y subtipo J, y recombinantes de las mismas. Un vector de encapsidación preferido codifica SEQ ID NO: 3 o la porción de proteína MA de SEQ ID NO: 2.

En diversas realizaciones, las células del sistema de encapsidación lentiviral pueden contener cualquiera de los vectores lentivirales de la invención.

25 En diversas realizaciones, las células del sistema de encapsidación lentiviral contienen SEQ ID NO: 1 o una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a SEQ ID NO: 1. En diversas realizaciones, las células del sistema de encapsidación lentiviral expresan una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, o una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

Métodos de producción de vectores de encapsidación

30 El texto describe métodos de preparación de vectores de encapsidación que codifican proteínas Gag y/o Pol no de subtipo B. El vector de encapsidación puede comprender cualquiera de las características tratadas en el presente documento. En particular, la presente invención se refiere a un método de generación de un vector de encapsidación lentiviral defectuoso en la replicación de cualquiera de la invención, comprendiendo el método insertar una secuencia de nucleótidos que codifica Gag-Pol de VIH-1 según la invención, respectivamente en un plásmido bajo el control de un promotor no del VIH para generar el vector de encapsidación. En una realización, el método

35 comprende insertar una secuencia de Gag y/o Pol de un virus de VIH-1 no de subtipo B en un plásmido bajo el control de un promotor no del VIH (por ejemplo, promotor del CMV) para generar un vector de encapsidación. El texto menciona una realización donde el vector de encapsidación codifica solo 1 proteína de VIH-1. En una realización, el vector de encapsidación codifica solo 2 proteínas de VIH-1. En una realización, el vector de encapsidación codifica solo 3 proteínas de VIH-1, seleccionadas de Gag, Pol, Rev y Tat. En una realización, el

40 vector de encapsidación codifica solo 4 proteínas de VIH-1, Gag, Pol, Rev y Tat.

En diversas realizaciones, el plásmido comprende uno o más de un promotor del CMV, un exón que codifica parte de Tat y Rev, un sitio donante de corte y empalme, un intrón que contiene un RRE, un sitio aceptor de corte y empalme, un exón que codifica parte de Tat y Rev, y una señal de poliadenilación.

45 En diversas realizaciones, el vector de encapsidación comprende un promotor del CMV, un exón que codifica parte de Tat y Rev, un sitio donante de corte y empalme, un intrón que contiene un RRE, un sitio aceptor de corte y empalme, un exón que codifica parte de Tat y Rev, y una señal de poliadenilación.

El virus de VIH-1 no de subtipo B se puede seleccionar de virus de subtipo A, subtipo C, subtipo D, subtipo E, subtipo F1, subtipo F2, subtipo G, subtipo H, y subtipo J, y recombinantes de los mismos.

50 En una realización, el método comprende proporcionar un vector de encapsidación que comprende una secuencia Gag de un virus de VIH-1 de subtipo B y sustituir las secuencias de Gag en el vector con secuencias de un virus de VIH-1 no de subtipo B.

El virus de VIH-1 no de subtipo B se puede seleccionar de virus de subtipo A, subtipo C, subtipo D, subtipo E, subtipo F1, subtipo F2, subtipo G, subtipo H y subtipo J, y recombinantes de las mismas. En una realización preferida, el virus de VIH-1 no de subtipo B es VIH-1 NDK.

Métodos de producción de vectores lentivirales

El texto también menciona métodos de uso de vectores de encapsidación que codifican proteínas Gag y/o Pol de VIH-1 no de subtipo B para generar vectores lentivirales. En una realización, el texto describe administrar un vector de encapsidación que codifica una proteína Gag o Pol de VIH-1 no de subtipo B a una célula con un vector lentiviral.

5 El vector de encapsidación puede comprender cualquiera de las características tratadas en el presente documento. La presente invención se refiere a un método *in vitro* para generar un partícula de vector lentiviral, comprendiendo el método administrar un vector de encapsidación según cualquiera de la invención a una célula con un vector lentiviral. En particular, el vector de encapsidación se transfecta en la célula. Además, en una realización particular, el vector de encapsidación está establemente integrado en el genoma de la célula.

10 El vector lentiviral comprende secuencias que actúan en cis para la encapsidación y transcripción inversa, que incluyen un sitio Ψ y sitio de unión al cebador. Preferentemente, el vector lentiviral comprende dos secuencias de LTR de VIH-1. En una realización, una de las LTR se deleta para las secuencias U3 y R. Preferentemente, el vector lentiviral comprende un tracto de polipurina central (cPPT) y una secuencia terminal central (CTS). El vector lentiviral codifica preferentemente una proteína lentiviral o no lentiviral, tal como un marcador de selección o

15 antígeno de tumor.

En una realización, el vector lentiviral comprende uno o más antígenos de VIH, preferentemente un antígeno de VIH-1. Más preferentemente, el antígeno es un antígeno Gag, Pol, Env, Vif, Vpr, Vpu, Nef, Tat o Rev. El antígeno puede ser un único antígeno, una mezcla de antígenos, un polipéptido antigénico, o una mezcla de polipéptidos antigénicos de estas proteínas. En una realización preferida, el vector lentiviral comprende un antígeno Gag p24 de VIH-1.

20 En una realización, el texto describe un vector lentiviral que comprende un promotor que contiene NIS. Un "promotor que contiene NIS" comprende un sitio de unión NF-Kb, un elemento de respuesta estimulado por interferón (ISRE) y un módulo SXY (SXY). Ejemplos de promotores que contienen NIS que existen de forma natural son el promotor de $\beta 2m$ y los promotores del gen de MHC de clase I. Estos promotores que contienen NIS que existen de forma natural generalmente se clonan o se reproducen a partir de la región promotora de un gen que codifica una proteína $\beta 2m$ o

25 una proteína de clase I de MHC, o se denomina supuestamente que codifican dichas proteínas en las bases de datos de genomas (antiguamente: base de datos de polinucleótidos NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/dna-rna>). Tanto las proteínas $\beta 2m$ como MHC de clase I entran en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Las secuencias promotoras de $\beta 2m$ y MHC de clase I también se denominan normalmente como tales en bases de datos del genoma - es decir, se indica que son secuencias promotoras de $\beta 2m$ y de MHC de clase I.

30 Los promotores de clase I de MHC y $\beta 2$ -microglobulina contienen las homologías estructurales compartidas de los promotores que contienen NIS. Estos promotores también comparten la capacidad de ser fuertemente activados en células dendríticas, así como de reducir la intensidad, en la mayoría de los otros tejidos del cuerpo humano.

En una realización, el vector de encapsidación y el vector lentiviral se introducen juntos en una célula para permitir la formación de partículas de vector lentiviral que contienen la proteína Gag producida por el vector de encapsidación y el ácido nucleico producido por el vector lentiviral. Preferentemente, esto se logra por cotransfección de las células con el vector de encapsidación y el vector lentiviral. Las células también se pueden transfectar con un ácido nucleico que codifica una proteína Env, preferentemente una glucoproteína G de VEV. Preferentemente, las partículas de vector lentiviral son capaces de la entrada, transcripción inversa y expresión en una célula hospedadora apropiada.

35

En una realización, el vector de encapsidación o el vector lentiviral está establemente integrado en células, y el vector no integrado se transfecta en las células para permitir la formación de partículas de vector lentiviral.

40

En una realización, el método comprende además recoger el vector lentiviral producido por las células.

En una realización, el método comprende además seleccionar un vector de encapsidación que encapsida un título más alto del vector lentiviral que un mismo vector de encapsidación que codifica una proteína Gag o Pol de subtipo B. Preferentemente, el título aumenta al menos 1,5 o 2 veces con respecto al vector de encapsidación que codifica una proteína Gag o Pol de subtipo B.

45

Partículas de vector lentiviral

El texto también describe partículas de vector lentiviral que comprenden proteínas Gag y/o Pol de VIH-1 no de subtipo B. Las proteínas Gag y Pol no de subtipo B pueden comprender cualquiera de las características tratadas en el presente documento.

50 En particular, la presente invención se refiere a un partícula de vector lentiviral que comprende proteínas Gag y Pol de VIH-1 seleccionadas del grupo que consiste en proteínas Gag y Pol de VIH-1 de VIH-1 NDK o proteínas Gag y Pol de VIH-1 de un subtipo D VIH-1 caracterizado porque la proteína Gag-Pol comprende una porción de proteína MA que tiene una o más de las siguientes características:

la ausencia de un ácido glutámico en la posición de aminoácido 12;

la ausencia de una arginina en la posición de aminoácido 15;

la ausencia de una valina en la posición de aminoácido 46; y

la ausencia de una leucina en la posición de aminoácido 61, en la que las posiciones de aminoácidos se numeran con respecto a SEQ ID NO: 5.

- 5 En particular, las proteínas Gag y Pol son proteínas Gag y Pol producidas expresando una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

La partícula de vector lentiviral comprende un ácido nucleico que comprende secuencias que actúan en cis para la encapsidación y transcripción inversa, que incluyen un sitio Ψ y sitio de unión al cebador en asociación con proteínas Gag, Pol y Env. Preferentemente, el ácido nucleico comprende dos secuencias LTR de VIH-1. En una realización, una de las LTR se deleta para las secuencias de U3 y R. Preferentemente, el ácido nucleico de la partícula de vector lentiviral comprende un tracto de polipurina central (cPPT) y una secuencia terminal central (CTS). El ácido nucleico codifica preferentemente una proteína lentiviral o no lentiviral, tal como un marcador de selección o antígeno de tumor. Preferentemente, la partícula de vector lentiviral comprende una glucoproteína de VEV.

10 Preferentemente, el vector lentiviral comprende un promotor que contiene NIS. En una realización, el promotor es una promotor de $\beta 2m$.

En una realización, el vector lentiviral comprende uno o más antígenos de VIH, preferentemente un antígeno de VIH-1. Más preferentemente, el antígeno es un antígeno Gag, Pol, Env, Vif, Vpr, Vpu, Nef, Tat o Rev.

Los vectores lentivirales de la invención se pueden administrar a una célula hospedadora, que incluye un hospedador humano.

20 La partícula de vector lentiviral puede contener un mecanismo de direccionamiento para tipos de células específicos. Véase, por ejemplo, Yang et al., Targeting lentiviral vectors to specific cell types in vivo, PNAS 113(31):11479-11484 (2006), que se incorpora por este documento como referencia. El direccionamiento se puede lograr mediante un anticuerpo que se une a una proteína de la superficie celular sobre una célula. El tipo de célula dirigido es preferentemente una célula dendrítica, un linfocito T, un linfocito B. Se prefiere el direccionamiento al tipo de célula dendrítica y se puede llevar a cabo mediante proteínas de la envoltura que se unen específicamente a una proteína de la superficie DC. Véase, por ejemplo, Yang et al., Engineered Lentivector Targeting of Dendritic Cells for In Vivo, Nat Biotechnol. 2008 March; 26(3): 326-334, que se incorpora por este documento como referencia.

25 El presente texto describe además el uso de los vectores lentivirales según la invención, especialmente en forma de partículas de vector lentiviral, para la preparación de composiciones terapéuticas o vacunas que pueden inducir o contribuir a la aparición o mejora de una reacción inmunológica contra epítopes, más particularmente los codificados por el transgén presente en los vectores.

Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción de plásmido

35 Se amplificó por PCR el gen *gag-pol*, usando dos cebadores y pNDK-N, un clon de VIH-1 NDK, como molde. Con el fin de obtener el plásmido pThV-GP-N, se digirió con EagI/Sall el producto de PCR y se insertó en la construcción de encapsidación p8.74, también digerida por EagI/Sall.

Ejemplo 2. Producción de vector lentiviral por transfección

40 Se produjo reserva de vector lentiviral usando pFLAP CMV GFP bis y pTHV-VEV.G (INDI-CO)bis en combinación con p8.74 o pThV-GP-N. Se hicieron 36 transfecciones, 18 con p8.74 y 18 con pThV-GP-N. Todo el sobrenadante se almacenó a -80 °C.

El plásmido pFLAP-CMV GFP bis codificó la proteína verde fluorescente (GFP), cuya expresión se puede detectar por citometría de flujo.

Ejemplo 3. Valoración de la producción de vector lentiviral

45 Se determinó el título de vector por la frecuencia de expresión de GFP en células 293T. Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos, en DMEM que contenía 10 % de FBS, hasta que alcanzaron una densidad de 1×10^5 células por pocillos. Las células se transdujeron entonces con diferente volumen de sobrenadante de vector en un volumen final de 300 μ l. Después de 2 horas, se añadió a cada pocillo 700 μ l de medio fresco que contenía 10 % de FBS. 72 horas después de la transducción, entonces se eliminó el medio y las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS; Gibco). Las células se eliminaron con 0,05 % de tripsina-EDTA (Gibco).
50 La tripsinización se detuvo mediante la adición de 300 μ l de DMEM completo, y las células se transfirieron a un tubo para FACS, después de lo cual se contó el número de células que expresaban GFP con un FACSCalibur (BD

Biosciences) usando una longitud de onda de excitación de 509 nm. Solo se consideró el porcentaje de células GFP positivas por debajo del 30 %.

Los resultados se muestran en la Figura 3. Se observó una diferencia significativa entre las producciones de vectores pThV-GP-N y p8.74, con títulos más altos obtenidos usando el plásmido pThV-GP-N. De hecho, el título de vector obtenido con el plásmido de encapsidación pThV-GP-N fue 2 veces superior al título de vector obtenido con el plásmido p8.74 clásicamente usado ($p < 0,001$ según la prueba de Student).

Ejemplo 4. Elevado título de vector lentiviral con pThV-GP-N

Se prepararon virus VIH-1 BRU y VIH-1 NDK en células 293T y se usaron para transducir células P4 CCR5. Estas células engloban un gen de luciferasa estable bajo el control de LTR de VIH: Si se transducen con proteína TAT (que es el caso cuando se infectan con un VIH WT), se expresa el gen LacZ y se puede medir una expresión de luciferasa. Se midieron la expresión de Gag p24 de VIH-1 y de luciferasa. Los resultados se muestran en la Figura 4, y confirman que el virus NDK no mutante tiene una tasa de transducción más alta que BRU no mutante.

Ejemplo 5. p24 elevado y título con pThV-GP-N

Se usaron diferentes relaciones de vectores de encapsidación p8.74 y pSD GP NDK para producir partículas de vector lentiviral. Para cada relación, se midieron el título y el nivel de P24. Los resultados se muestran en la Figura 5 y demuestran que es la presencia del plásmido de encapsidación de NDK la que es responsable de la potenciación de los títulos de producción y del nivel de P24.

Ejemplo 6. Procesamiento de p24 disminuido con pThV-GP-N

Se usaron vectores de encapsidación p8.74 y pTHV-GP-N para producir sobrenadantes que contenían partículas de vector lentiviral. Se realizaron transferencias Western en los sobrenadantes usando el MAB anti-P24 NIH (183-H12-5C). Los resultados se muestran en la Figura 6, y confirman que la diferencia entre los plásmidos de encapsidación de NDK y BRU se basa en la producción de la proteína P24 y precursor, ya que parece que NDK genera una mayor síntesis de P24 (presencia de precursor de P24 en el sobrenadante viral) cuando BRU muestra solo P24 en el sobrenadante viral.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Theravectys

Institut Pasteur

<120> USO DE PROTEÍNAS GAG NO DE SUBTIPO B PARA ENCAPSIDACIÓN LENTIVIRAL

<130> THERA.11.3

<140> PCT/US2012/

<141> 25-09-2012

<150> 11306222.8

<151> 26-09-2011

<160> 67

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 4298

<212> ADN

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 1

5

atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggaaaattag atacatggga aagaattcgg	60
ttacggccag gaggaaagaa aaaatatgca ctaaacatt tgatatgggc aagcagggag	120
ctagaacgat ttacacttaa tcctggcctt ttagagacat cagaaggctg taaacaaata	180
ataggacagc tacaaccatc tattcaaaca ggatcagaag aaattagatc attatataat	240
acagtagcaa ccctctattg tgtacatgaa aggatagagg taaaagacac caaagaagct	300
gtagaaaaga tggaggaaga acaaaacaaa agtaagaaaa agacacagca agcagcagct	360
gatagcagcc aggtcagcca aaattaccct atagtgcaga acctacaggg gcaaatggta	420
catcaggcca tatcacctag aactttgaac gcatgggtaa aagtaataga agaaaaggcc	480
ttcagcccg aagtaatacc catgttttca gcattatcag aaggagccac cccacaagat	540
ttaaacacca tgctaaacac agtgggggga catcaagcag ctatgcaa gctaaaagag	600
accatcaatg acgaagctgc agaatgggac agattacatc cagtgcattgc agggcctgtt	660
gcaccaggcc aatgagaga accaagggga agtgatatag caggaactac tagtaccctt	720
caggaacaaa tagcatggat gacaagcaac ccacctatcc cagtaggaga aatctataaa	780
agatggataa tcctgggatt aaataaaata gtaagaatgt atagccctgt cagcattttg	840
gacataagac agggaccaaa ggaacctttt agagactatg tagaccggtt ctataaaact	900
ctaagagccg agcaagcttc acaggatgta aaaaactgga tgacagaaac cttgttggtc	960
caaatgcaa acccagattg taaaactatc taaaagcat tgggaccaca ggctacacta	1020
gaagaaatga tgacagcatg ccaggagtg ggggggcccg gccataaagc aagagttttg	1080
gctgaggcaa tgagccaagt aacaggttca gctactgcag taatgatgca gagaggcaat	1140

ES 2 683 820 T3

tttaagggcc	caagaaaaag	tattaagtgt	ttcaactgtg	gcaaggaagg	gcacacagca	1200
aaaaattgca	gggcccctag	aaaaaagggc	tggttgaaat	gcggaaggga	aggacaccaa	1260
atgaaagatt	gcactgaaag	acaggctaata	tttttaggga	agatttggcc	ttcccacaag	1320
ggaaggccgg	ggaattttct	tcagagcaga	ccagagccaa	cagccccacc	agcagagagc	1380
ttcggtttg	gggaggagat	aaccccctct	cagaaacagg	agcagaaaga	caaggaactg	1440
tatcctttag	cttccctcaa	atcactcttt	ggcaacgacc	cctcgtcaca	ataaagatag	1500
ggggacagct	aaaggaagct	ctattagata	caggagcaga	tgatacagta	ttagaagaaa	1560
taaatttgcc	aggaaaatgg	aagccaaaaa	tgataggggg	aattggagggt	tttatcaaag	1620
taagacagta	tgatcaaata	ctcatagaaa	tctgtggata	taaagctatg	ggtacagtat	1680
tagtaggacc	tacacctgtc	aacataattg	gaagaaatth	gttgaccag	attggctgca	1740
ctttaaatth	tccaattagt	cctattgaaa	ctgtaccagt	aaaattaaag	ccaggaatgg	1800
atggcccaaa	agttaaacaa	tggccattga	cgaagaaaaa	ataaaagcat	taacagaaat	1860
ttgtacagaa	atggaaaagg	aaggaaaaat	ttcaagaatt	gggcctgaaa	atccatataa	1920
tactccaata	tttgccataa	agaaaaaaga	cagtaccaag	tgagaaaaat	tagtagatth	1980
cagagaactt	aataagagaa	ctcaagatth	ctgggagggt	caattaggaa	taccgcattc	2040
tgcagggtg	aaaaagaaaa	aatcagtaac	agtactggat	gtgggtgatg	catatthctc	2100
agttccctta	gatgaagatt	ttaggaaata	taccgcattt	accataccta	gtataaacaa	2160
tgagacacca	gggattagat	atcagtacaa	tgtgctccca	cagggatgga	aaggatcacc	2220
ggcaatatth	caaagtagca	tgacaaaaat	cttagagccc	tttagaaaac	aaaatccaga	2280
aatagttatc	tatcaataca	tggatgattt	gtatgtagga	tctgacttag	aaatagggca	2340
gcatagaaca	aaaatagagg	aattaagaga	acatctattg	aggtggggat	ttaccacacc	2400
agataaaaaa	catcagaaag	aacctccatt	tctttggatg	ggttatgaac	tccatcctga	2460
taaatggaca	gtacagccta	taaacctgcc	agaaaaagaa	agctggactg	tcaatgatat	2520
acagaagtta	gtggggaaat	taaactgggc	aagccagatt	tatgcaggaa	ttaaagtaaa	2580
gcaattatgt	aaactcctta	ggggaaccaa	agcactaaca	gaagtagtac	cactaacaga	2640
agaagcagaa	ttagaactgg	cagaaaacag	ggaaattcta	aaagaaccag	tacatggagt	2700
gtattatgac	ccatcaaaag	acttaatagc	agaactacag	aaacaagggg	acggccaatg	2760
gacataccaa	atthtatcaag	aaccatttha	aaatctaaaa	acaggaaagt	atgcaagaac	2820
gaggggtgcc	cacactaatg	atgtaaaaa	attaacagag	gcagtgcata	aaatagccac	2880
agaaagcata	gtgatatggg	gaaagactcc	taaatthtaa	ctaccatac	aaaaggaaac	2940
atgggaaaca	tggtggatag	agtattggca	agccacctgg	attcctgagt	gggaatttgt	3000
caataccctt	ccttttagtaa	aattatggta	ccagttagag	aaggaacca	taataggagc	3060

ES 2 683 820 T3

```

agaaaactttc tatgtatgatg gggcagctaa tagagagact aaattaggaa aagcaggata 3120
tgttactgac agaggaagac agaaagttgt ccctttcact gacacgacaa atcagaagac 3180
tgagttacaa gcaattaatc tagctttaca ggattcggga ttagaagtaa acatagtaac 3240
agattcacaa tatgcactag gaatcattca agcacaacca gataagagtg aatcagagtt 3300
agtcagtcaa ataatagagc agctaataaa aaaggaaaag gtttacctgg catgggtacc 3360
agcacacaaa ggaattggag gaaatgaaca agtagataaa ttagtcagtc agggaatcag 3420
gaaagtacta tttttggatg gaatagataa ggctcaggaa gaacatgaga aatatcacaa 3480
caattggaga gcaatggcta gtgattttta cctaccacct gtggtagcga aagaaatagt 3540
agctagctgt gataaatgtc agctaaaagg agaagccatg catggacaag tagactgtag 3600
tccaggaata tggcaattag attgtacaca tctggaagga aaagttatcc tggtagcagt 3660
tcatgtagcc agtggctata tagaagcaga agttattcca gcagaaacgg ggcaagaaac 3720
agcatacttt ctcttaaaat tagcaggaag atggccagta aaagtagtac atacagataa 3780
tggcagcaat ttcaccagtg ctacagttaa ggccgcctgt tgggtgggcag ggatcaaaca 3840
ggaatttgga attccctaca atccccaag tcaaggagta gtagaatcta tgaataaaga 3900
attaaagaaa attataggac aggtaagaga tcaagctgaa catcttaaga cagcagtaca 3960
aatggcagta tttatccaca attttaaaag aaaagggggg attgggggat acagtgcagg 4020
ggaaagaata atagacataa tagcaacaga catacaaact agagaattac aaaaacaaat 4080
cataaaaaatt caaaattttc gggtttatta cagggacagc agagatccaa tttggaaagg 4140
accagcaaag cttctctgga aagggtgaagg ggcagtagta atacaagaca atagtgcacat 4200
aaaggtagta ccaagaagaa aagtaaagat cattagggat tatggaaaac agatggcagg 4260
tgatgattgt gtggcaagta gacaggatga ggattaac 4298

```

<210> 2

<211> 1499

5

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 2

```

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

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

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

```

10

ES 2 683 820 T3

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

ES 2 683 820 T3

Gln Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val
 305 310 315 320
 Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro
 325 330 335
 Gln Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly
 340 345 350
 Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln Val Thr
 355 360 365
 Gly Ser Val Thr Ala Val Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Lys Gly Pro
 370 375 380
 Arg Lys Ser Ile Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Thr Ala
 385 390 395 400
 Lys Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly Arg
 405 410 415
 Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Ser Glu Arg Gln Ala Asn Phe Leu
 420 425 430
 Gly Lys Ile Trp Pro Ser His Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe Leu Gln
 435 440 445
 Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ser Phe Gly Phe Gly
 450 455 460
 Glu Glu Ile Thr Pro Ser Gln Lys Gln Glu Gln Lys Asp Lys Glu Leu
 465 470 475 480
 Tyr Pro Leu Ala Ser Leu Lys Ser Leu Phe Gly Asn Asp Pro Ser Ser
 485 490 495
 Gln Phe Phe Arg Glu Asp Leu Ala Phe Pro Gln Gly Lys Ala Gly Glu
 500 505 510
 Phe Ser Ser Glu Gln Thr Arg Ala Asn Ser Pro Thr Ser Arg Glu Leu
 515 520 525
 Arg Val Trp Gly Gly Asp Asn Pro Leu Ser Glu Thr Gly Ala Glu Gly
 530 535 540
 Gln Gly Thr Val Ser Phe Ser Phe Pro Gln Ile Thr Leu Trp Gln Arg
 545 550 555 560

ES 2 683 820 T3

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

ES 2 683 820 T3

	805		810		815
Lys Ile Leu Glu Pro Phe Arg Lys Gln Asn Pro Glu Ile Val Ile Tyr	820		825		830
Gln Tyr Met Asp Asp Leu Tyr Val Gly Ser Asp Leu Glu Ile Gly Gln	835		840		845
His Arg Thr Lys Ile Glu Glu Leu Arg Glu His Leu Leu Arg Trp Gly	850		855		860
Phe Thr Thr Pro Asp Lys Lys His Gln Lys Glu Pro Pro Phe Leu Trp		870		875	880
Met Gly Tyr Glu Leu His Pro Asp Lys Trp Thr Val Gln Pro Ile Lys		885		890	895
Leu Pro Glu Lys Glu Ser Trp Thr Val Asn Asp Ile Gln Lys Leu Val		900		905	910
Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln Ile Tyr Ala Gly Ile Lys Val Lys		915		920	925
Gln Leu Cys Lys Leu Leu Arg Gly Thr Lys Ala Leu Thr Glu Val Val		930		935	940
Pro Leu Thr Glu Glu Ala Glu Leu Glu Leu Ala Glu Asn Arg Glu Ile		945		950	955
Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr Tyr Asp Pro Ser Lys Asp Leu		965		970	975
Ile Ala Glu Leu Gln Lys Gln Gly Asp Gly Gln Trp Thr Tyr Gln Ile		980		985	990
Tyr Gln Glu Pro Phe Lys Asn Leu Lys Thr Gly Lys Tyr Ala Arg Thr		995		1000	1005
Arg Gly Ala His Thr Asn Asp Val Lys Gln Leu Thr Glu Ala Val		1010		1015	1020
Gln Lys Ile Ala Thr Glu Ser Ile Val Ile Trp Gly Lys Thr Pro		1025		1030	1035
Lys Phe Lys Leu Pro Ile Gln Lys Glu Thr Trp Glu Thr Trp Trp		1040		1045	1050

ES 2 683 820 T3

Ile Glu	Tyr Trp	Gln Ala	Thr	Trp Ile	Pro Glu	Trp	Glu Phe	Val
1055			1060			1065		
Asn Thr	Pro Pro	Leu Val	Lys	Leu Trp	Tyr Gln	Leu	Glu Lys	Glu
1070			1075			1080		
Pro Ile	Ile Gly	Ala Glu	Thr	Phe Tyr	Val Asp	Gly	Ala Ala	Asn
1085			1090			1095		
Arg Glu	Thr Lys	Leu Gly	Lys	Ala Gly	Tyr Val	Thr	Asp Arg	Gly
1100			1105			1110		
Arg Gln	Lys Val	Val Pro	Phe	Thr Asp	Thr Thr	Asn	Gln Lys	Thr
1115			1120			1125		
Glu Leu	Gln Ala	Ile Asn	Leu	Ala Leu	Gln Asp	Ser	Gly Leu	Glu
1130			1135			1140		
Val Asn	Ile Val	Thr Asp	Ser	Gln Tyr	Ala Leu	Gly	Ile Ile	Gln
1145			1150			1155		
Ala Gln	Pro Asp	Lys Ser	Glu	Ser Glu	Leu Val	Ser	Gln Ile	Ile
1160			1165			1170		
Glu Gln	Leu Ile	Lys Lys	Glu	Lys Val	Tyr Leu	Ala	Trp Val	Pro
1175			1180			1185		
Ala His	Lys Gly	Ile Gly	Gly	Asn Glu	Gln Val	Asp	Lys Leu	Val
1190			1195			1200		
Ser Gln	Gly Ile	Arg Lys	Val	Leu Phe	Leu Asp	Gly	Ile Asp	Lys
1205			1210			1215		
Ala Gln	Glu Glu	His Glu	Lys	Tyr His	Asn Asn	Trp	Arg Ala	Met
1220			1225			1230		
Ala Ser	Asp Phe	Asn Leu	Pro	Pro Val	Val Ala	Lys	Glu Ile	Val
1235			1240			1245		
Ala Ser	Cys Asp	Lys Cys	Gln	Leu Lys	Gly Glu	Ala	Met His	Gly
1250			1255			1260		
Gln Val	Asp Cys	Ser Pro	Gly	Ile Trp	Gln Leu	Asp	Cys Thr	His
1265			1270			1275		
Leu Glu	Gly Lys	Val Ile	Leu	Val Ala	Val His	Val	Ala Ser	Gly
1280			1285			1290		

ES 2 683 820 T3

Tyr	Ile	Glu	Ala	Glu	Val	Ile	Pro	Ala	Glu	Thr	Gly	Gln	Glu	Thr
1295						1300					1305			
Ala	Tyr	Phe	Leu	Leu	Lys	Leu	Ala	Gly	Arg	Trp	Pro	Val	Lys	Val
1310						1315					1320			
Val	His	Thr	Asp	Asn	Gly	Ser	Asn	Phe	Thr	Ser	Ala	Thr	Val	Lys
1325						1330					1335			
Ala	Ala	Cys	Trp	Trp	Ala	Gly	Ile	Lys	Gln	Glu	Phe	Gly	Ile	Pro
1340						1345					1350			
Tyr	Asn	Pro	Gln	Ser	Gln	Gly	Val	Val	Glu	Ser	Met	Asn	Lys	Glu
1355						1360					1365			
Leu	Lys	Lys	Ile	Ile	Gly	Gln	Val	Arg	Asp	Gln	Ala	Glu	His	Leu
1370						1375					1380			
Lys	Thr	Ala	Val	Gln	Met	Ala	Val	Phe	Ile	His	Asn	Phe	Lys	Arg
1385						1390					1395			
Lys	Gly	Gly	Ile	Gly	Gly	Tyr	Ser	Ala	Gly	Glu	Arg	Ile	Ile	Asp
1400						1405					1410			
Ile	Ile	Ala	Thr	Asp	Ile	Gln	Thr	Arg	Glu	Leu	Gln	Lys	Gln	Ile
1415						1420					1425			
Ile	Lys	Ile	Gln	Asn	Phe	Arg	Val	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Ser	Arg	Asp
1430						1435					1440			
Pro	Ile	Trp	Lys	Gly	Pro	Ala	Lys	Leu	Leu	Trp	Lys	Gly	Glu	Gly
1445						1450					1455			
Ala	Val	Val	Ile	Gln	Asp	Asn	Ser	Asp	Ile	Lys	Val	Val	Pro	Arg
1460						1465					1470			
Arg	Lys	Val	Lys	Ile	Ile	Arg	Asp	Tyr	Gly	Lys	Gln	Met	Ala	Gly
1475						1480					1485			
Asp	Asp	Cys	Val	Ala	Ser	Arg	Gln	Asp	Glu	Asp				
1490						1495								

<210> 3

<211> 129

5

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 3

ES 2 683 820 T3

```

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Glu Ala Val Glu Lys Met Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
          100          105          110

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

```

Tyr

<210> 4

<211> 129

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 4

```

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

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

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

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

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

```

10

ES 2 683 820 T3

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

Thr Lys Glu Ala Val Glu Lys Met Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
100 105 110

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

Tyr

<210> 5

<211> 132

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 5

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 Asn Gln Val
115 120 125

Ser Gln Asn Tyr
130

10

<210> 6

<211> 75

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 6

```

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
65          70          75

```

5

<210> 7

<211> 73

<212> PRT

10

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 7

```

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

Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Leu Lys His Ile
20          25          30

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

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

Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu
65          70

```

15

<210> 8

<211> 75

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 8

```

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

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

His Leu 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 Glu Gln Leu
  50              55              60

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu
 65              70              75

```

5

<210> 9

<211> 75

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

10

<400> 9

```

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

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu
 65              70              75

```

15

<210> 10

<211> 75

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

20

<400> 10

ES 2 683 820 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 Arg Leu Lys
          20           25           30

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

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

His Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu
65           70           75

```

<210> 11

5 <211> 73

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 11

10

```

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

Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Leu Lys His Ile
          20           25           30

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

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

Ser Leu Pro Thr Gly Ser Glu Glu Leu
65           70

```

<210> 12

<211> 75

15 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 12

ES 2 683 820 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
 65 70 75

<210> 13

<211> 73

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 13

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

10

<210> 14

<211> 75

<212> PRT

15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 14

ES 2 683 820 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 Val 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 Lys Ile Leu Gly Gln Leu
50 55 60

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu
65 70 75

<210> 15

<211> 75

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 15

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

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

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

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

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Ile
65 70 75

<210> 16

<211> 75

15 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 16

ES 2 683 820 T3

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

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Gln Tyr Arg 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 Gly Gly Cys Lys Gln Ile Leu Ala Gln Leu
50 55 60

His Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu
65 70 75

<210> 17

<211> 73

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 17

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

Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Arg Tyr Arg Leu Lys His Ile
20 25 30

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

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

Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu
65 70

<210> 18

<211> 75

15 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 18

ES 2 683 820 T3

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

<210> 19

<211> 75

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 19

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 Arg Leu Lys
 20 25 30
 His Leu 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
 65 70 75

10

<210> 20

<211> 75

<212> PRT

15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 20

ES 2 683 820 T3

```

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

Glu Arg Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Ser 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

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

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu
65           70           75

```

<210> 21

<211> 75

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 21

```

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 Gln Leu Lys
          20           25           30

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

Ser 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
65           70           75

```

10

<210> 22

<211> 75

<212> PRT

15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 22

ES 2 683 820 T3

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

Glu Arg 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 Ile Gly Gln Leu
50 55 60

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu
65 70 75

<210> 23

5 <211> 75

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 23

10

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 Arg Leu Lys
20 25 30

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

Gly Leu Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Lys Gln Ile Leu Ala Gln Leu
50 55 60

His Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu
65 70 75

<210> 24

<211> 72

15 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<220>

<221> característica_misc

20 <222> (18)..(18)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que existe de forma natural

<220>

<221> característica_misc

5 <222> (51)..(51)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que existe de forma natural

<400> 24

10

```

Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp Glu Lys Ile
1           5           10           15
Arg Xaa Arg Gln Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys His Ile Val
                20           25           30

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

Glu Thr Xaa Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Glu Gln Leu Gln Pro Ala
50           55           60

Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu
65           70

```

<210> 25

<211> 75

15 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 25

20

```

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 Gly Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu
50           55           60

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu
65           70           75

```

<210> 26

<211> 75

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

5

<400> 26

```

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

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

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

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

Gln Pro Ser Ile Gln Thr Gly Ser Glu Glu Ile
65              70              75

```

10

<210> 27

<211> 75

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

15

<400> 27

```

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
65              70              75

```

20

<210> 28

<211> 75

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 28

5

```

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

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

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

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

Gln Pro Ser Ile Gln Thr Gly Ser Glu Glu Ile
65              70              75

```

<210> 29

<211> 75

10

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 29

```

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala 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 Leu Asn Pro
          35              40              45

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

Gln Pro Ser Leu Lys Thr Gly Ser Glu Glu Leu
65              70              75

```

15

<210> 30

<211> 75

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 30

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

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

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

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Lys Gln Ile Ile Ala Gln Leu
50 55 60

Gln Ser Ser Ile Gln Thr Gly Ser Glu Glu Ile
65 70 75

<210> 31

<211> 73

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 31

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

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

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

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

Ala Ile Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu
65 70

<210> 32

<211> 73

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 32

```

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

Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Arg Lys Arg Tyr Arg Leu Lys His Ile
          20           25           30

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

Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Lys Gln Ile Ile Ser Gln Leu Gln Pro
50           55           60

Ser Leu Lys Thr Gly Ser Glu Glu Leu
65           70

```

5 <210> 33

<211> 61

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

10 <400> 33

```

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
50           55           60

```

15 <210> 34

<211> 61

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

20 <400> 34

ES 2 683 820 T3

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

<210> 35

<211> 61

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 35

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala 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 Leu Asn Pro
 35 40 45
 Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Ile
 50 55 60

10

<210> 36

<211> 61

<212> PRT

15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 36

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Glu Trp
 1 5 10 15
 Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Arg Lys Thr Tyr Lys Leu Lys
 20 25 30

ES 2 683 820 T3

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

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

<210> 37

<211> 59

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 37

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

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

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

10 Leu Glu Thr Ser Gly Gly Cys Arg Gln Ile Met
50 55

<210> 38

<211> 59

<212> PRT

15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 38

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

Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Arg Lys Arg Tyr Arg Leu Lys His Ile
20 25 30

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

Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Lys Gln Ile Ile
50 55

20

<210> 39

<211> 61

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

5 <400> 39

```

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

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

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

Gly Leu Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Lys Gln Leu Met
 50              55              60

```

<210> 40

10 <211> 61

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<220>

15 <221> característica_misc

<222> (54)..(54)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que existe de forma natural

<220>

20 <221> característica_misc

<222> (61)..(61)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que existe de forma natural

<400> 40

25

ES 2 683 820 T3

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

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

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

Asp Leu Leu Glu Thr Xaa Glu Gly Cys Gln Gln Ile Xaa
50 55 60

<210> 41

<211> 59

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 41

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

Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Ile Lys His Leu
20 25 30

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

Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Gln Gln Ile Met
50 55

<210> 42

<211> 61

15 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 42

ES 2 683 820 T3

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

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

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

Gly Leu Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Gln Lys Ile Met
50 55 60

<210> 43

<211> 61

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 43

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

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

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

Asp Leu Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Gln Gln Ile Met
50 55 60

10

<210> 44

<211> 61

<212> PRT

15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 44

ES 2 683 820 T3

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

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

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

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

<210> 45

<211> 61

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 45

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

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

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

Gly Leu Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Gln Gln Ile Leu
50 55 60

10

<210> 46

<211> 61

<212> PRT

15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<220>

<221> característica_misc

<222> (42)..(42)

20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que existe de forma natural

<220>

<221> característica_misc

<222> (49)..(49)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que existe de forma natural

<400> 46

```

Met Gly Ala Arg Ala Ser Ile Leu Ser Gly Gly Arg Leu Asp Ala Trp
1          5          10          15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Leu Lys
5          20          25          30

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

Xaa Leu Leu Glu Ser Ala Glu Gly Cys Gln Gln Ile Met
50          55          60

```

<210> 47

<211> 59

10 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 47

```

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

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

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

Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Gln Gln Ile Ile
15          50          55

```

<210> 48

<211> 59

<212> PRT

20 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 48

ES 2 683 820 T3

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

Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Leu Lys His Leu
20 25 30

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

Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Gln Gln Ile Met
50 55

<210> 49

<211> 61

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 49

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

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

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

10 Gly Leu Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Arg Gln Ile Ile
50 55 60

<210> 50

<211> 61

<212> PRT

15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 50

ES 2 683 820 T3

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

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

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

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

<210> 51

<211> 61

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 51

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

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

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

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

10

<210> 52

<211> 61

<212> PRT

15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 52

ES 2 683 820 T3

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

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

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

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

<210> 53

<211> 59

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 53

Ala Arg Ala Ser Ile Leu Arg Gly Gly Gln Leu Asp Arg Trp Glu Lys
1 5 10 15

Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys His Tyr Met Leu Lys His Leu
20 25 30

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

Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Lys Gln Ile Met
50 55

10

<210> 54

<211> 61

<212> PRT

15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 54

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

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

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

ES 2 683 820 T3

Gly Leu Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Gln Gln Ile Ile
50 55 60

<210> 55

<211> 61

5

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 55

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

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

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

10

Gly Leu Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Gln Gln Leu Ile
50 55 60

<210> 56

<211> 61

<212> PRT

15

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 56

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

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

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

20

Gly Leu Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Gln Gln Ile Ile
50 55 60

<210> 57

<211> 61

<212> PRT

ES 2 683 820 T3

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 57

```

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

5      Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Met Ile Lys
          20          25          30

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

Gly Leu Leu Glu Thr Ala Glu Gly Cys Gln Gln Ile Ile
50          55          60

```

<210> 58

<211> 61

10 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 58

```

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

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

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

15      Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Lys Ile Ile
          50          55          60

```

<210> 59

<211> 61

<212> PRT

20 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 59

ES 2 683 820 T3

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

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

His Leu Ile Trp Ala Gly Arg Glu Leu Asp Arg Phe Ala Leu Asp Pro
35 40 45

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

<210> 60

<211> 61

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 60

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

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

His Leu Ile Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asp Ser
35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Thr Glu Gly Cys Arg Lys Ile Ile
50 55 60

10

<210> 61

<211> 61

<212> PRT

15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 61

ES 2 683 820 T3

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

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

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

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

<210> 62

<211> 38

5 <212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 62

Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Leu Lys His Leu Val Trp Ala Ser Arg
1 5 10 15

Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asn Pro Gly Leu Leu Glu Thr Thr Glu
20 25 30

Gly Cys Lys Gln Ile Ile
35

10

<210> 63

<211> 61

<212> PRT

15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 63

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

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

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

Asp Leu Leu Glu Thr Ala Asp Gly Cys Gln Gln Ile Leu
50 55 60

<210> 64

<211> 61

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

5

<400> 64

```

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

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

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

Asp Leu Leu Asp Thr Ala Glu Gly Cys Leu Gln Leu Ile
      50              55              60

```

10

<210> 65

<211> 61

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

15

<400> 65

```

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

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

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

Gly Leu Leu Glu Thr Pro Glu Gly Cys Leu Gln Ile Ile
      50              55              60

```

20

<210> 66

<211> 61

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<220>

<221> característica_misc

<222> (61)..(61)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que existe de forma natural

5 <400> 66

```

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

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

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

Asp Leu Leu Glu Thr Ala Asp Gly Cys Leu Lys Ile Xaa
 50              55              60

```

<210> 67

10 <211> 61

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 67

15

```

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

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

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

Gly Leu Leu Glu Ser Ala Lys Gly Cys Gln Gln Ile Leu
 50              55              60

```

REIVINDICACIONES

1. Un vector de encapsidación lentiviral defectuoso en la replicación que no codifica una Env de VIH-1 funcional y que carece de un sitio Ψ y que codifica Gag-Pol de VIH-1 seleccionado del grupo que consiste en Gag-Pol de VIH-1 de VIH-1 NDK o Gag-Pol de VIH-1 de un VIH-1 de subtipo D, caracterizado por que la proteína Gag-Pol comprende una porción de proteína MA que tiene una o más de las siguientes características:
 - la ausencia de un ácido glutámico en la posición de aminoácido 12;
 - la ausencia de una arginina en la posición de aminoácido 15;
 - la ausencia de una valina en la posición de aminoácido 46; y
 - la ausencia de una leucina en la posición de aminoácido 61, en la que las posiciones de aminoácidos se numeran con respecto a SEQ ID NO: 5.
2. El vector de la reivindicación 1, en el que la proteína Gag-Pol de VIH-1 es una proteína Gag-Pol de VIH-1 de VIH-1 NDK.
3. El vector de la reivindicación 2, en el que el vector codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
4. Un método de generación de un vector de encapsidación lentiviral defectuoso en la replicación de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, comprendiendo el método insertar una secuencia de nucleótidos que codifica Gag-Pol de VIH-1 según la reivindicación 1, 2 o 3, respectivamente, en un plásmido bajo el control de un promotor no del VIH para generar el vector de encapsidación.
5. Un método *in vitro* de generación de una partícula de vector lentiviral, comprendiendo el método administrar un vector de encapsidación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 a una célula con un vector lentiviral.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el vector de encapsidación se transfecta en la célula.
7. El método de la reivindicación 5, en el que el vector de encapsidación se integra establemente en el genoma de la célula.
8. Una célula aislada que comprende el vector de encapsidación lentiviral defectuoso en la replicación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
9. La célula de la reivindicación 8, en la que el vector se integra establemente en el genoma de la célula.
10. Una partícula de vector lentiviral que comprende las proteínas Gag y Pol de VIH-1 seleccionadas del grupo que consiste en las proteínas Gag y Pol de VIH-1 de VIH-1 NDK o proteínas Gag y Pol de VIH-1 de un VIH-1 de subtipo D, caracterizada porque la proteína Gag-Pol comprende una porción de proteína MA que tiene una o más de las siguientes características:
 - la ausencia de un ácido glutámico en la posición de aminoácido 12;
 - la ausencia de una arginina en la posición de aminoácido 15;
 - la ausencia de una valina en la posición de aminoácido 46; y
 - la ausencia de una leucina en la posición de aminoácido 61, en la que las posiciones de aminoácidos se numeran con respecto a SEQ ID NO: 5.
11. La partícula de vector lentiviral de la reivindicación 10, en la que las proteínas Gag y Pol son proteínas Gag y Pol producidas expresando una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

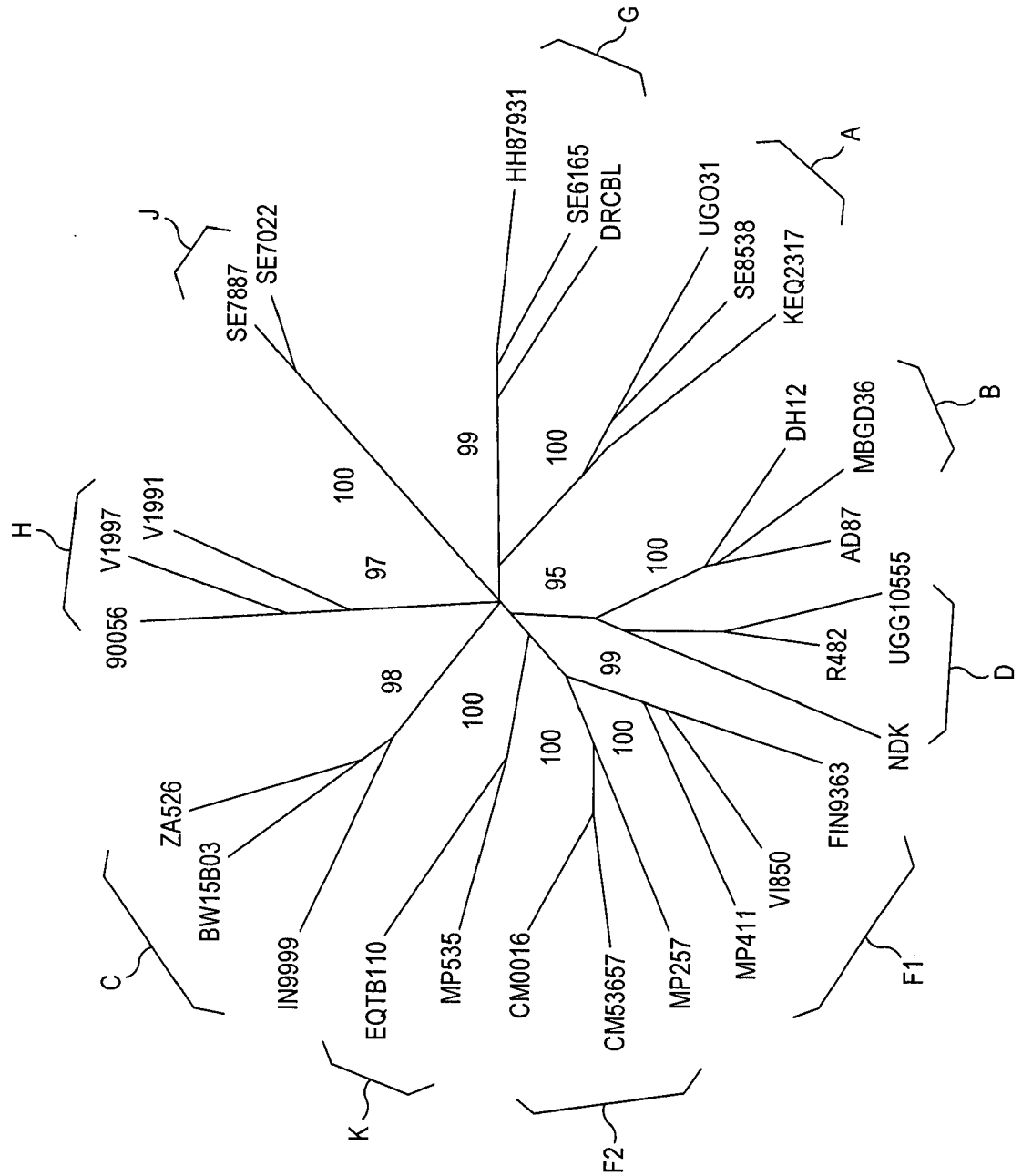


FIG. 1

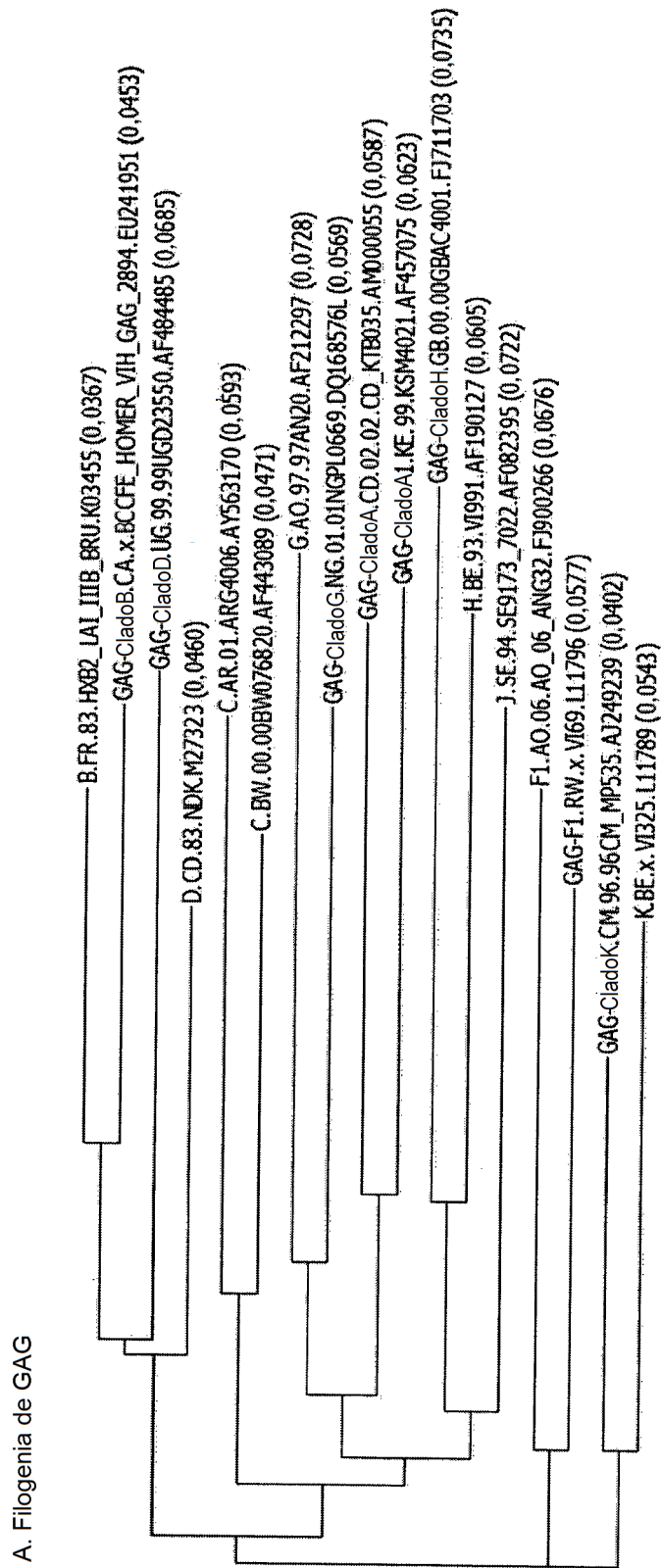


FIG. 2

B. Filogenia de POL

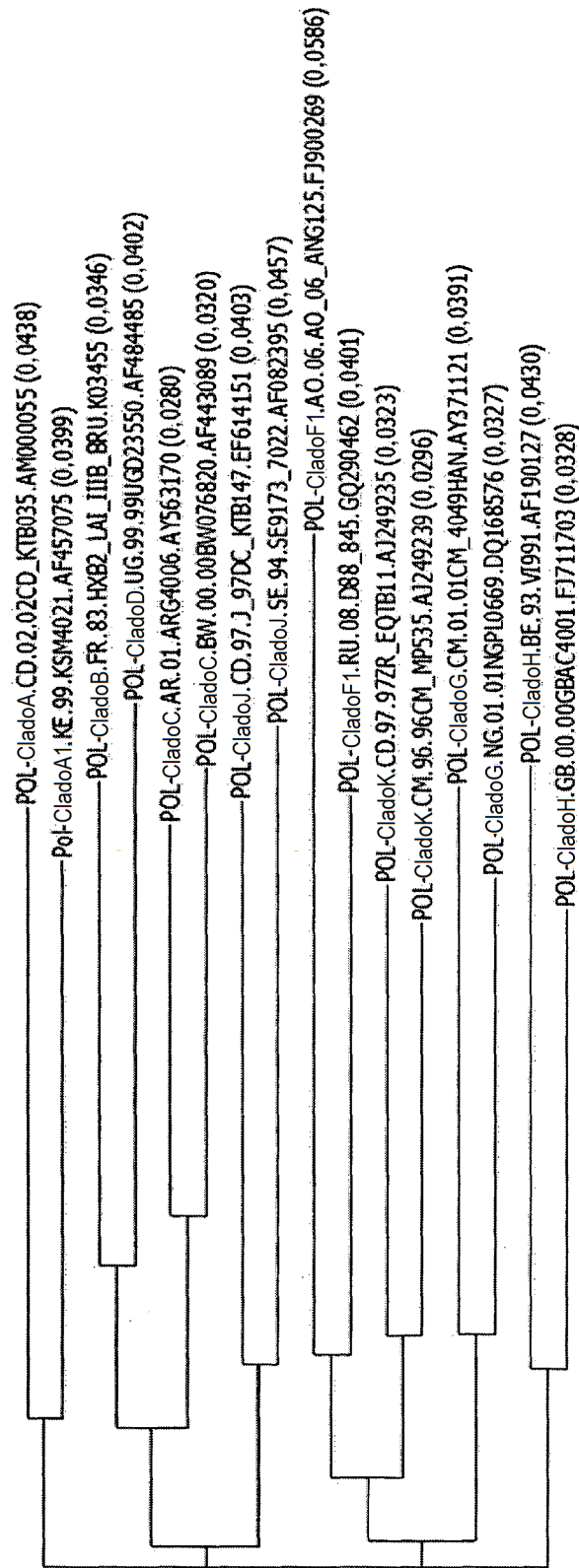


FIG. 2 Continuación

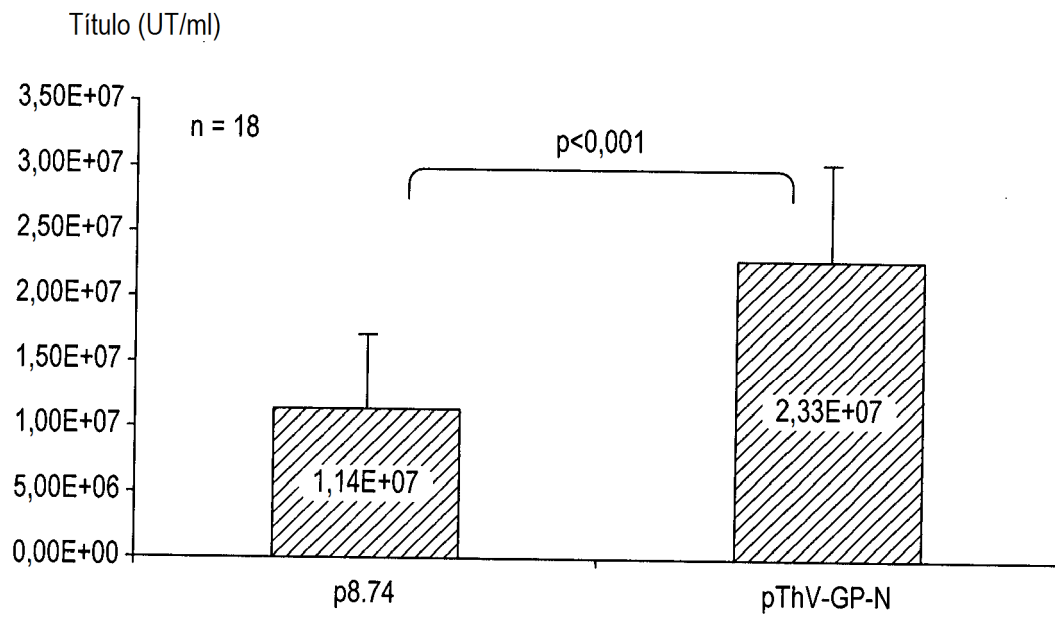


FIG. 3

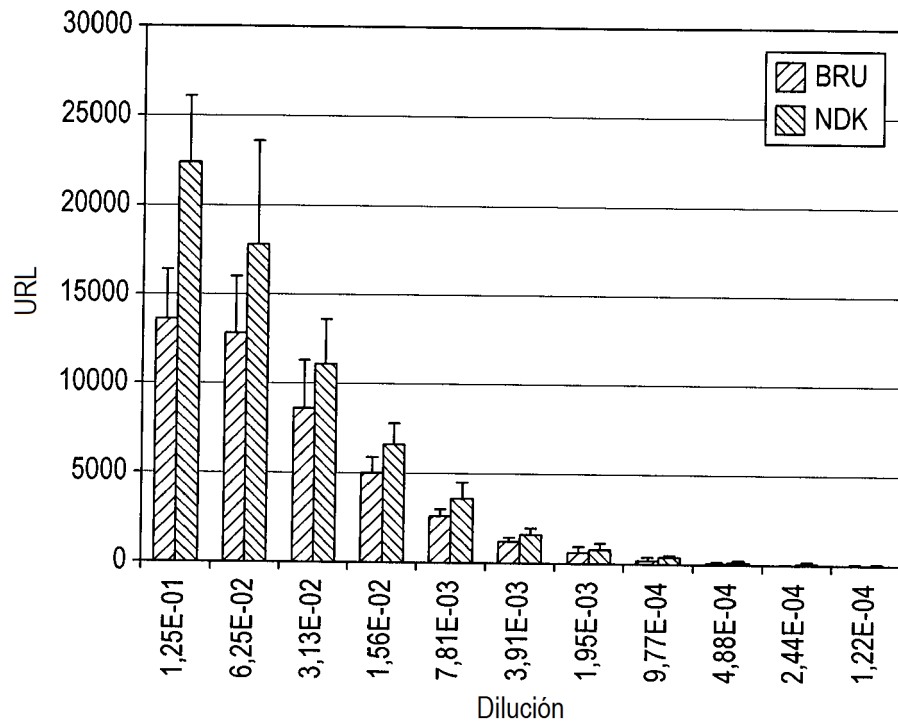


FIG. 4A

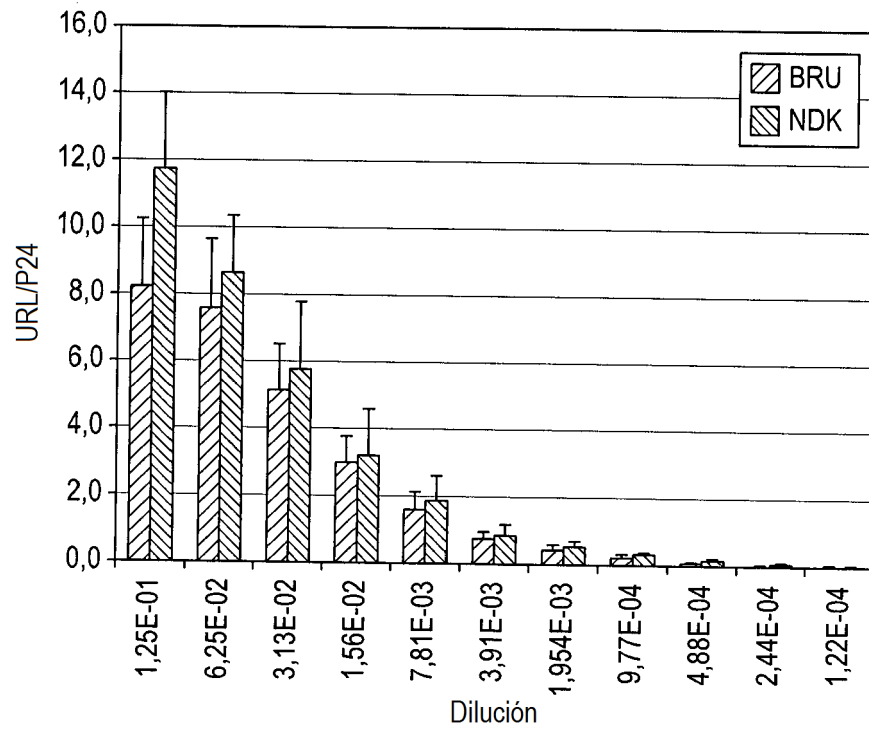


FIG. 4B

	A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3	I3	J3	K3
pThV GP-N	0µl	1µl	2µl	3µl	4µl	5µl	6µl	7µl	8µl	9µl	10µl
P8,74	10µl	9µl	8µl	7µl	6µl	5µl	4µl	3µl	2µl	1µl	0µl
Título	6,39E+06	8,68E+06	1,16E+07	3,67E+07	5,00E+07	4,31E+07	4,40E+07	2,75E+07	3,32E+07	3,80E+07	3,50E+07
P24	430	400	361	521	958	800	1075	742	600	620	790

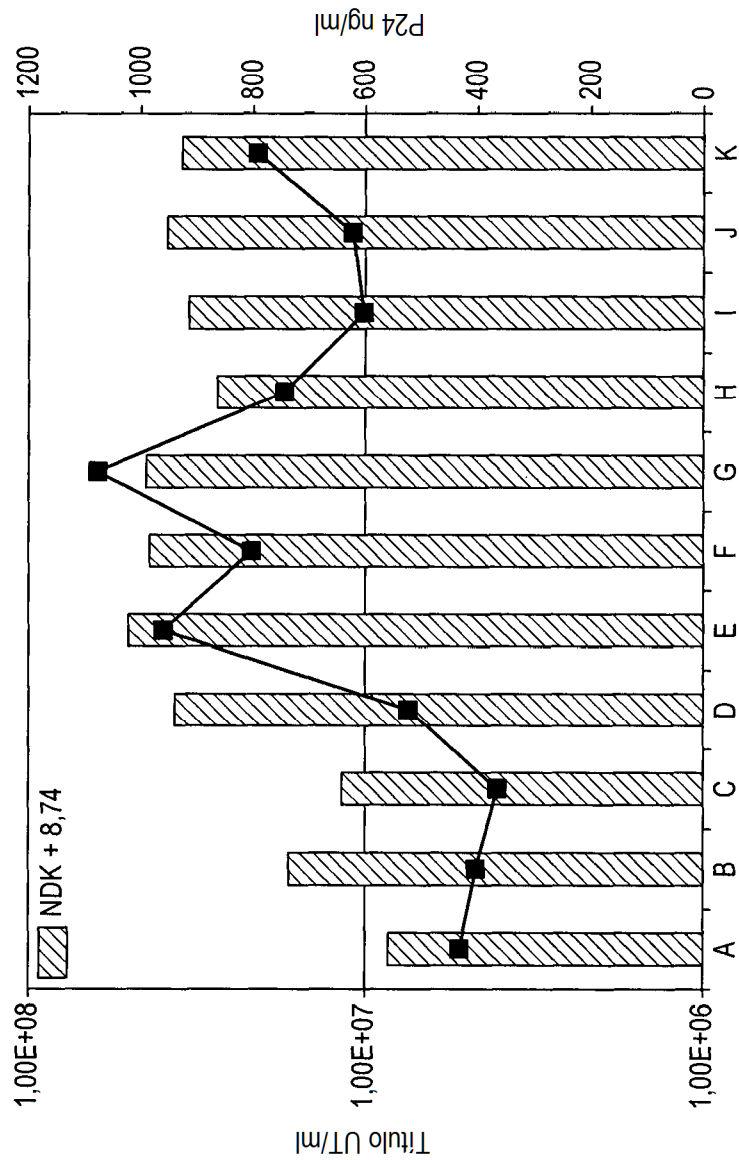
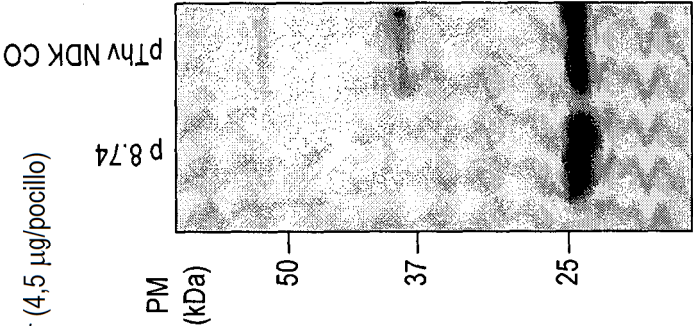


FIG. 5

Mab p24 (NIH, 183-H12-5C)

Sobrenadantes de vector (4,5 µg/pocillo)



KDa	POL
10	Proteasa
66/51	RT
32	Integrasa

FIG. 6

P17-CladoB.FR.83.HXB2 LAI IIIB BRU.K03455 P17-CladoD.CD.83.NDK.M27323	1 (1) MGARASVILSGGELDRWEKIRLRPGGKKKYKLKHIVWASRELERF AV NPGL (1) MGARASVILSGGKLDTWERIRLRPGGKKKYALKHLI WASRELERF TL NPGL	* * * * *	50
P17-CladoB.FR.83.HXB2 LAI IIIB BRU.K03455 P17-CladoD.CD.83.NDK.M27323	51 (51) LETSEGCRQILGQLQPSLQTGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTKEA (51) LETSEGCKQIIGQLQPSIQTGSEELRSLYNTVATLYCVHERIEVKDTKEA	* * * * *	100
P17-CladoB.FR.83.HXB2 LAI IIIB BRU.K03455 P17-CladoD.CD.83.NDK.M27323	101 (101) LDKIEEQNKSKKKAQQAADTGHSNQVSQNY (101) VERMEEQNKSKKKTQQAADS--S-QVSQNY	* * * * *	132

FIG. 7

P17-CladoB.FR.83.HXB2.LAI.IIIB.BRU.K03455
 P17-B.UY.01.01UYTRA1092.AY781126
 P17-CladoB.CN.05.05CNHB.dw107.DQ833416
 P17-CladoB.US.x.B4522TOB8U.GQ371250
 P17-CladoB.ZA.03.03ZAPS045MB2.DQ396398
 P17-CladoB.CO.01.PCM074.AY561240
 P17-CladoB.CY.01.CY075.FJ388916
 P17-CladoB.YE.02.02YES08.AY795905
 P17-CladoB.US.x.X1537TOB8U.GQ371695
 P17-CladoB.US.02.L8124P.FJ469741
 P17-CladoB.CY.03.CY005.EU673412
 P17-CladoB.AR.04.04AR143170.DQ383750
 P17-CladoB.AU.87.MBC925.AF042101
 P17-CladoB.US.x.AC16079Day1034Dom.EU616649
 P17-CladoB.US.x.X5597TOB8U.GQ371704
 P17-CladoB.AR.05.2005.03.FJ155192
 P17-CladoB.CA.x.BCCFETOMERHIVGAG2991.EU242048
 P17-CladoB.AR.05.2005.11.FJ155200
 P17-CladoB.AU.x.4922142.AY857059
 P17-CladoB.US.04.E58.43.EF363126
 P17-CladoD.CD.83.NDK.M27323

FIG. 8

P17-cladOB.FR.83.HXB2 LAI IIB_BRU.K03455
 P17-cladOB.D.83.NDK.M27323
 P17-cladOB.FR.x.Vls20.FJ649608
 P17-cladOB.UG.02.TC025704.AY803405
 P17-cladOB.UG.99.99UGD23550.AF484485
 P17-cladOB.CM.01.01CM_0009BBY.AY371155

FIG. 9

	1	*	*	*	*
P17-CladoB.FR.83.HXB2 LAI IIB_BRU.K03455	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoD.CD.83.NDK.M27323	(1)	MGARASVLSGGKLD	TWERIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoD.FR.x.Vis20.FJ649608	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoD.UG.02.TC025704.AY803405	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoD.UG.99.99UGD23550.AF484485	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoD.CM.01.01CM.0009BBY.AY371155	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoG.CU.99.Cu87.AY586549	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoG.CM.04.944.5.FJ389366	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoG.NG.01.01NGPL0669.DQ168576L	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoG.BE.96.DRCBL.AF084936	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoG.SE.93.SE6165.AF061642	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoA.CD.02.02.CD.KTB035.AM000055	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoA.RW.x.VI415.L11791	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoA1.AU.04.PS1044.Day177.DQ676873	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoA1.KE.00.MSA4070.AF457081	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoA1.KE.99.KSM4021.AF457075	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoC.BR.04.04BR013.AY727522	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoC.ZM.05.ZM1223M.FJ606168	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoC.BR.04.04BR013.AY727522#2	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoC.ZM.05.ZM1223M.FJ606168#2	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoC.IL.99.99ET7.AY255824	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoAE.HK.2004.HK001	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-01 AE.TH.1995.95TNIH022	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-01 AE.TH.1993.93TH062	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-01 AE.HK.2004.HK001	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoF1.AO.06.AO.06 ANG32.FJ900266	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoF1.AR.06.2006_03.FJ155204	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoF1.BR.02.02BR170.FJ771007	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoF1.RW.x.VI69.L11796	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoF2.CM.x.CA16.AF247520	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoH.BE.93.VI991.AF190127	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoH.CD.91.VI557.L11793	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoH.CF.90.056.AF005496	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoH.GB.00.00GBAC4001.FJ711703	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI
P17-CladoJ.SE.94.SE9173_7022.AF082395	(1)	MGARASVLSGGKLD	WEKIRLR	PGGKKYK	KHLVWASRELERFALNPGLLETSEGCROI

FIG. 10