

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 706 501**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2007 E 16156199 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 3037429**

54 Título: **Vacunas de VIH mejoradas**

30 Prioridad:

28.07.2006 US 833856 P

28.07.2006 US 833861 P

16.02.2007 US 890352 P

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

29.03.2019

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)**

**3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 706 501 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas de VIH mejoradas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a vacunas de VIH mejoradas, y vacunas para su uso en métodos mejorados para inducir respuestas inmunes, y para inmunizar profilácticamente y/o terapéuticamente individuos frente a VIH.

10 Antecedentes de la invención

El genoma del VIH es altamente plástico debido a una alta tasa de mutación y compensación funcional. Esta alta tasa de mutación es conducida por al menos dos mecanismos: la baja fidelidad de la transcriptasa inversa (RT) vírica dando como resultado al menos una mutación por ciclo de replicación, y los efectos dobles del gen del factor celular antiretroviral APOBEC3G y el gen accesorio del factor de infectividad vírica Vif. Los genomas con cada posible mutación y muchas mutaciones dobles se generan durante cada ciclo de replicación, dando como resultado tremenda diversidad antigénica. Por consiguiente, se ha argumentado que una vacuna candidata derivada de un aislado individual no puede provocar suficiente reactividad cruzada para proteger frente a diversos virus de VIH circulantes. Los estudios recientes han sugerido que los inmunógenos consenso (Gao, F., y col. 2005. "Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type 1 group m consensus envelope glycoprotein". *J. Virol.* 79:1.154-63.; Scriba, T.J., y col. 2005. "Functionally-inactive and immunogenic Tat, Rev and Nef DNA vaccines derived from sub-Saharan subtype C human immunodeficiency virus type 1 consensus sequences". *Vaccine* 23:1.158-69) o inmunógenos ancestrales (Doria-Rose, N.A., y col. 2005. "Human Immunodeficiency Virus Type 1 subtype B Ancestral Envelope Protein Is Functional and Elicits Neutralizing Antibodies in Rabbits Similar to Those Elicited by a Circulating Subtype B Envelope". *J. Virol.* 79:11.214-11.224; Gao, F., y col. 2004. "Centralized immunogens as a vaccine strategy to overcome HIV-1 diversity". *Expert Rev.*

Vaccines 3:S161-S168; Mullins, J.I., y col. 2004. "Immunogen sequence: the fourth tier of AIDS vaccine design". *Expert Rev. Vaccines* 3:S151-S159; Nickle, D.C., y col. 2003. "Consensus and ancestral state HIV vaccines". *Science* 299:1.515-1.517) pueden ser útiles a este respecto. Sin embargo, los estudios iniciales de estos planteamientos mostraron mejora inmune celular relativamente modesta inducida por estos inmunógenos.

Recientemente Derdeyn y col. analizaron secuencias de glucoproteína de la envoltura del VIH-1 subtipo C en ocho parejas de transmisión heterosexual africanas y encontraron que longitud más corta de V1, V2 y V4 y menos glucanos son los rasgos comunes compartidos por las secuencias obtenidas de transmisores tempranos (Derdeyn, C.A., y col. 2004. "Envelope-constrained neutralization-sensitive HIV-1 after heterosexual transmission". *Science* 303:2.019-2.022.). Estos datos sugieren que los antígenos que imitan tales virus podrían tener relevancia para los virus de transmisión temprana. Sin embargo, tales estructuras transmisores tempranos no se han observado para todos los subtipos (Chohan, B., y col. 2005. "Selection for Human Immunodeficiency Virus Type 1 envelope glycosylation variants with shorter V1-V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels". *J. Virol.* 79:6.528-6.531). Sin embargo, la incorporación de bucles V más cortos en un inmunógeno de la envoltura puede tener otros beneficios, tales como la mejora de la sensibilidad para CD4 soluble (Pickora, C., y col. 2005. "Identification of two N-linked glycosylation sites within the core of the Simian Immunodeficiency virus glycoprotein whose removal enhances sensitivity to soluble CD4". *J. Virol.* 79:12.575-12.583), y se debería considerar.

Los estudios han mostrado la importancia de las respuestas de LCT específico al VIH-1 en el control de la carga vírica durante la infección aguda y asintomática y el desarrollo del SIDA. Sin embargo, no está claro si las vacunas de ADN basadas en la envoltura actuales son tan potentes como es necesario. Se han usado varios métodos para incrementar los niveles de expresión de los inmunógenos del VIH-1, tales como la optimización de codón (Andre, S., y col. 1998. "Increased immune response elicited by DNA vaccination with asynthetic gp120 sequence with optimized codon usage". *J. Virol.* 72:1.497-503; Deml, L., y col. A. 2001. "Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 gag protein". *J. Virol.* 75:10.991-11.001), optimización de ARN (Muthumani, K., y col. 2003. "Novel engineered HIV-1 East African Clade-A gp160 plasmid construct induces strong humoral and cell-mediated immune responses in vivo". *Virology* 314:134-46; Schneider, R., M. y col. 1997. "Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation". *J. Virol.* 71:4.892-4.903) y la adición de las secuencias líderes de inmunoglobulina que tienen estructura secundaria de ARN débil (Yang, J.S., y col. 2001. "Induction of potent Th1-Type immune responses from a novel DNA vaccine for West Nile Virus New York Isolate (WNV-NY1999)". *J. Infect Diseases* 184:809-816).

El documento WO2005/028625 describe inmunógenos para inducir anticuerpos que neutralizan aislados primarios de VIH y/o a un inmunógeno que induce una respuesta inmune de linfocito T.

65

Sumario de la invención

5 La presente invención proporciona una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:2 y fragmentos de la SEQ ID NO:2 que comprenden 600 o más aminoácidos de la SEQ ID NO:2, en donde la secuencia de aminoácidos induce una respuesta inmune frente a VIH.

La presente invención se refiere a construcciones de ácidos nucleicos y proteínas codificadas por las mismas que proporcionan dianas inmunogénicas frente a la cuales se puede generar una respuesta inmune anti-VIH.

10 La presente invención proporciona secuencias consenso para la proteína de la envoltura del VIH subtipo A.

La presente invención proporciona construcciones que codifican tales secuencias de proteínas, vacunas que comprenden tales proteínas y/o moléculas de ácido nucleico que codifican tales proteínas.

15 La presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican tales secuencias de proteína que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:1; fragmentos de la SEQ ID NO:1 que comprenden 1.890 o más nucleótidos de la SEQ ID NO:1 y secuencias que tienen al menos 90 % de similitud con la SEQ ID NO:1. La presente invención se refiere a la molécula de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO:16.

20 La presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: secuencias de nucleótidos que codifican la SEQ ID NO:2; fragmentos de las secuencias de nucleótidos que codifican la SEQ ID NO:2 que comprenden 600 o más aminoácidos de la SEQ ID NO:2, en donde la secuencia de aminoácidos induce una respuesta inmune frente a VIH. La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden tales moléculas de ácido nucleico y el uso de la composición farmacéutica en un método de inducción de una respuesta inmune en un individuo frente a VIH.

La presente invención proporciona además vacuna recombinante que comprende tales moléculas de ácido nucleico.

30 La presente invención proporciona además patógenos atenuados vivos que comprenden tales moléculas de ácido nucleico.

35 La presente invención proporciona proteínas que comprenden las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO:2, y fragmentos de la SEQ ID NO:2 que comprenden 600 o más aminoácidos de la SEQ ID NO:2, en donde la secuencia de aminoácidos induce una respuesta inmune frente a VIH. La presente invención proporciona además proteínas que comprenden la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:16.

40 La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden tales proteínas y el uso de la composición farmacéutica en un método de inducción de una respuesta inmune en un individuo frente a VIH.

La presente invención proporciona además vacuna recombinante que comprende tales proteínas.

La presente invención proporciona además patógenos atenuados vivos que comprenden tales proteínas.

45 Breve descripción de las figuras

50 La Figura 1 muestra una comparación de las secuencias de aminoácidos de EY2E1-B y EK2P-B. La secuencia líder de IgE está subrayada. Las regiones recuadradas muestran regiones variables. El * indica seis restos importantes implicados en la utilización de CCR5. El sitio de escisión está indicado por una flecha. El dominio de transmembrana se muestra por la línea de puntos.

55 La Figura 2 muestra relaciones filogenéticas de dos secuencias de la envoltura del VIH-1 subtipo B. Se incluyeron cuarenta y dos secuencias de la envoltura del VIH-1 subtipo B, EY2E1-B, EK2P-B, dos secuencias del subtipo D y dos del subtipo C (grupo extraño) en el análisis filogenético. Las secuencias de la envoltura del subtipo B que representan una amplia muestra de diversidad eran de los siguientes 11 países: Argentina (1); Australia (6); China (1); Francia (4); Alemania (1); Gran Bretaña (2); Italia (1); Japón (1); Países Bajos (4); España (1); Estados Unidos (20). Las secuencias EY2E1-B y EK2P-B se muestran en recuadros negros.

60 La Figura 3 muestra la expresión de inmunógenos de envoltura. El panel A muestra los resultados del análisis de transferencia Western de los genes de EY2E1-B y EK2P-B. Las células de RD se sometieron a transfección con diferentes plásmidos. 48 horas después, se recogieron los lisados celulares. Las muestras se analizaron por transferencia Western y se sondaron con monoclonal (2G12) de gp120 del VIH-1. En cuanto al control de carga, la mancha se separó y se sondó de nuevo con un anticuerpo anti-actina monoclonal. El panel B muestra los resultados del ensayo de inmunofluorescencia de los genes de EY2E1-B y EK2P-B. Las células de RD transfectadas que expresan proteínas de la envoltura mostraron fluorescencia roja típica. El anticuerpo F105 monoclonal específico a la envoltura del VIH-1 sirvió como fuente del anticuerpo primario.

65 La Figura 4 muestra las titulaciones totales del anticuerpo IgG en los sueros de los ratones inmunizados. El panel A muestra la medición de las respuestas del anticuerpo específico a la envoltura del subtipo B. El panel B

muestra la medición de las respuestas del anticuerpo específico a la envoltura del subtipo A/E. El panel C muestra la medición de las respuestas del anticuerpo específico a la envoltura del subtipo C. Las respuestas inmunes humorales después de la inmunización con las construcciones de ADN pEY2E1-B y pEK2P-B se detectaron por el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). Cada ratón se inmunizó intramuscularmente tres veces, cada una de 100 µg de ADN a intervalos bisemanales. Los ratones de cada grupo (n=3) se sangraron una semana después de la tercera inmunización y los sueros igualmente reagrupados se diluyeron en tampón de bloqueo y se analizaron como se describe en Materiales y métodos. Los sueros reagrupados recogidos de ratones inmunizados con pVAX se usaron como control. La absorbancia (DO) se midió a 450 nm. Cada punto de dato representa tres valores de DO promedio de suero de tres ratones por grupo y los valores representan la media de ELISA obtenida en tres ensayos separados.

La Figura 5 muestra la inducción de respuestas inmunes mediadas por célula por pEY2E1-B en tanto ratones BalB/C como ratones transgénicos HLA-A2. Las frecuencias de las células formadoras de mancha (SFC) de IFN-γ específico a la envoltura consenso del subtipo B por millón de esplenocitos después de la vacunación de ADN con pEY2E1-B y pEK2P-B se determinaron por ensayo ELISpot en tanto ratones BalB/C (Panel A) como ratones transgénicos (Panel C). Las frecuencias de células formadoras de mancha de IFN-γ específico a la envoltura consenso del subtipo B, pobres en CD8 por millón de esplenocitos después de la vacunación de ADN con pEY2E1-B y pEK2P-B se determinaron también en tanto ratones BalB/C (Panel B) como ratones transgénicos (Panel D). Los esplenocitos se aislaron de ratones inmunizados individuales (tres ratones por grupo) y se estimularon *in vitro* con grupos de péptidos de la envoltura del subtipo B consenso solapados. Se incluyeron ratones inmunizados con pVAX cadena principal como control negativo. Los valores son las medias+desviaciones estándar de las medias de SFC de IFN-γ. (Panel E). La caracterización de los epítotos dominantes específicos a la envoltura consenso del subtipo B. Los esplenocitos recogidos de ratones BalB/C vacunados con pEY2E1-B y pEK2P-B, respectivamente, se cultivaron con 29 grupos de péptido de la envoltura consenso del VIH-1 subtipo B durante 24 horas. Las células secretoras de IFN-γ se determinaron por ensayo ELISpot como se describió anteriormente.

La Figura 6 muestra reactividad cruzada inducida por pEY2E1-B en tanto ratones BalB/C como ratones transgénicos HLA-A2. Las respuestas inmunes de linfocito T aditivas en ratones BalB/C inducidas por vacunación con pEY2E1-B y pEK2P-B frente a cuatro grupos de péptido individuales de péptidos de la envoltura del VIH-1 MN (Panel A), VIH-1 grupo M (Panel B), péptidos de la envoltura consenso del subtipo C (Panel C) y dos péptidos de la envoltura de aislado del subtipo C (Paneles D y E) se midieron por ensayo ELISpot de IFN-γ. También se midieron las respuestas inmunes de linfocito T aditivas en los ratones transgénicos HLA-A2 inducidas por vacunación con pEY2E1-B y pEK2P-B frente a cuatro grupos de péptido individuales de péptidos de la envoltura del VIH-1 MN (Panel F), VIH-1 grupo M (Panel G), péptidos de la envoltura consenso del subtipo C (Panel H) y dos péptidos de la envoltura de aislado del subtipo C (Paneles I y J). Se incluyeron ratones inmunizados con pVAX cadena principal como control negativo.

La Figura 7 muestra la caracterización de los epítotos dominantes específicos a la envoltura del subtipo B MN en tanto ratones BalB/C (Panel A) como ratones transgénicos HLA-A2 (Panel B) inmunizados con pEY2E1-B y pEK2P-B. Los esplenocitos recogidos de los ratones BalB/C vacunados con pEY2E1-B y pEK2P-B y los ratones transgénicos, respectivamente, se cultivaron con 29 grupos de péptido de la envoltura del VIH-1 subtipo B MN durante 24 horas. Las células secretoras de IFN-γ se determinaron por ensayo ELISpot como se describió anteriormente.

La Figura 8 muestra una representación esquemática de dominios funcionales de E72E1-B (aproximadamente 700+ aminoácidos).

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

Los paneles A y B de la Figura 10 muestran que una respuesta inmune celular fuerte es inducida por E72E1-B. Los paneles A y B de la Figura 11 muestran que las respuestas inmunes celulares de reacción cruzada fuertes y amplias son inducidas por E72E1-B.

Los paneles A-D de la Figura 12 muestran que las respuestas inmunes celulares de clado cruzado fuertes son inducidas por E72E1-B.

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

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

Los paneles A y B de la Figura 15 muestran los datos de los estudios de la respuesta celular provocada por pEY3E1-C.

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

Los paneles A-D de la Figura 17 muestran los datos de los estudios de las respuestas celulares de reacción cruzada provocadas por pEY3E1-C dentro del mismo clado.

Los paneles A y B de la Figura 18 muestran los datos de los estudios de las respuestas celulares de reacción cruzada provocadas por pEY3E1-C. El panel A muestra los datos de ELISpot de IFN-γ específico a env del subtipo C (Uruguay). El panel B muestra los datos de ELISpot de IFN-γ específico a env del subtipo C (S. África).

Los paneles A-F de la Figura 19 muestran los datos de los estudios de las respuestas celulares de reacción cruzada provocadas por pEY3E1-C entre clados.

Los paneles A-X de la Figura 20 muestran los datos de los estudios de las respuestas inmunes provocadas por construcciones consenso de gag del VIH-1.

La Figura 21 ilustra el ciclo de vida de VPH en el epitelio del tracto genital.

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

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

5 La Figura 24 incluye una ilustración de la construcción genética p1667 que incluye secuencias codificantes para proteínas E6 y E7 de VPH, y pVAX, plásmido cadena principal que carece del inserto de VPH y se usa como control negativo.

Los paneles A-D de la Figura 25 muestran las respuestas inmunes celulares inducidas por el inmunógeno de ADN p1667.

10 La Figura 26 muestra los resultados del mapeo del epítipo inmunodominante.

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

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

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

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

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

20 La Figura 32 muestra respuestas inmunes celulares aumentadas a inmunógenos consenso del VIH-1 con inyección conjunta IM de IL-12 codificada por plásmido seguido de electroporación (EP). Los ELISpot de IFN-γ se realizaron dos semanas después de la (a) primera inmunización, (b) segunda inmunización, y (c) tercera inmunización (como se ve en comparación con las otras tres). Las respuestas a env se representan como barras negras y a gag se representan como barras blancas con los datos mostrados como respuestas medias±EEM de grupo amontonadas.

25 La Figura 33 muestra respuestas inmunes celulares de reacción cruzada aumentadas con electroporación intramuscular. Después de tres inmunizaciones, la respuesta inmune de linfocito T total en macacos inmunizados con pEY2E1-B frente a cuatro grupos de péptido de los péptidos del VIH-1 grupo M se determinó por ELISpot de IFN-γ. Los datos se muestran como medias±EEM de grupo amontonadas.

30 La Figura 34 muestra respuestas de memoria aumentadas a inmunógenos del VIH-1 con electroporación IM y el plásmido de IL-12. Cinco meses después de la última inmunización, los ensayos ELISpot se realizaron para determinar las respuestas memoria específicas a antígeno a gag y env en los grupos inmunizados IM y EP con y sin inmunización conjunta con el plásmido de IL-12. Los datos se muestran como respuestas medias±EEM de grupo.

35 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Definiciones

40 Como se usa en el presente documento, la expresión “condiciones de hibridación estricta” o “condiciones estrictas” se refiere a las condiciones bajo las que una molécula de ácido nucleico hibridará otra molécula de ácido nucleico, pero no otras secuencias. Las condiciones estrictas son dependientes de secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas mayores. Generalmente, las condiciones estrictas se seleccionan por ser aproximadamente 5 °C menos que la temperatura del punto de fusión (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) al que el 50 % de las sondas complementarias a la secuencia diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Puesto que las secuencias diana están en general presentes en exceso, a T_m, 50 % de las sondas está ocupadas en equilibrio. Generalmente, las condiciones estrictas serán aquellas en las que la concentración de sal es menos de aproximadamente 1,0 M de ion de sodio, generalmente 0,01 a 1,0 M de ion de sodio (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas, cebadores u oligonucleótidos (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 60 °C para sondas más largas, cebadores u oligonucleótidos. Las condiciones estrictas también se pueden conseguir con la adición de agentes desestabilizantes, tal como formamida.

55 La homología de secuencia para nucleótidos y aminoácidos se puede determinar usando FASTA, BLAST y BLAST con huecos (Altschul y col., *Nuc. Acids Res.*, 1997, 25, 3.389) y el programa informático PAUP* 4.0b10 (D.L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts). El “porcentaje de similitud” se calcula usando el programa informático PAUP* 4.0b10 (D.L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts). La similitud promedio de la secuencia consenso se calcula en comparación con todas las secuencias en el árbol filogenético (véase las Figuras 2 y 14).

60 En resumen, el algoritmo BLAST, el cual significa “Basic Local Alignment Search Tool” (herramienta de investigación de alineamiento local básico) es adecuado para determinar la similitud de secuencia (Altschul y col., *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403-410). El programa informático para la realización del análisis BLAST está públicamente disponible a través del “National Center for Biotechnology information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica la primera identificación del par de secuencia de alta puntuación (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia consulta (*query*) que o bien se empareja o satisface alguna puntuación T umbral

valorada positiva cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de palabra de las cercanías (Altschul y col., supra). Estas coincidencias (*hits*) de palabra de la cercanía iniciales actúan como semillas para iniciar investigaciones para encontrar HSP que las contiene. Las coincidencias de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tan lejos como la puntuación de alineamiento acumulativa se pueda incrementar. La extensión para las coincidencias de palabra en cada dirección se paran cuando: 1) la puntuación de alineamiento acumulativo cae en la cantidad X a partir de su máximo valor alcanzado; 2) la puntuación acumulativa va a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de resto de puntuación negativa; o 3) se alcanza el final de cada secuencia. Los parámetros del algoritmo Blast W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa Blast usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89, 10.915-10.919) alineamientos (B) de 50, expectación (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST (Karlin y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 5.873-5.787) y BLAST con huecos realizaron un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), lo cual proporciona un indicio de la probabilidad por la que un apareamiento entre dos secuencias de nucleótidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a otro si la probabilidad de suma más pequeña en comparación del ácido nucleico de ensayo con el otro ácido nucleico es menos de aproximadamente 1, preferentemente menos de aproximadamente 0,1, más preferentemente menos de aproximadamente 0,01, y lo más preferentemente menos de aproximadamente 0,001.

Como se usa en el presente documento, el término "construcción genética" se refiere a las moléculas de ADN o ARN que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína. La secuencia codificante incluye las señales de iniciación y finalización ligadas de manera operativa a elementos reguladores que incluyen un promotor y la señal de poliadenilación capaces de dirigir la expresión en las células del individuo al que se administra la molécula de ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, el término "forma expresable" se refiere a construcciones génicas que contienen los elementos reguladores necesarios operables ligados a una secuencia codificante que codifica una proteína de modo que cuando están presente en la célula del individuo, se expresará la secuencia codificante.

Resumen

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

La invención proporciona vacunas de VIH mejoradas proporcionando proteínas y construcciones genéticas que codifican proteínas con epítopos que las hacen particularmente eficaces como inmunógenos frente al que se puede inducir las respuestas inmunes anti-VIH. Por consiguiente, las vacunas se pueden proporcionar para inducir una respuesta inmune terapéutica o profiláctica. En algunas realizaciones, los medios para administrar el inmunógeno es una vacuna de ADN, una vacuna recombinante, una vacuna de subunidad de proteína, una composición que comprende el inmunógeno, una vacuna atenuada o una vacuna inactivada. En algunas realizaciones, la vacuna comprende una combinación seleccionada de los grupos que consisten en: una o más vacunas de ADN, una o más vacunas recombinantes, una o más vacunas de subunidad de proteína, una o más composiciones que comprenden el inmunógeno, una o más vacunas atenuadas y una o más vacunas inactivadas.

Una vacuna según la invención se administra a un individuo para modular la actividad del sistema inmune del individuo y de ese modo aumentar la respuesta inmune frente a VIH. Cuando una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína es absorbida por las células del individuo la secuencia de nucleótidos se expresa en las células y la proteína de ese modo es administrada al individuo. Según algunos aspectos de la presente invención, se proporcionan composiciones y métodos que profilácticamente y/o terapéuticamente inmunizan un individuo frente a VIH.

La presente invención se refiere a composiciones para administrar moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la invención ligada de manera operativa a elementos reguladores. Los aspectos de la presente invención se refieren a composiciones de una vacuna recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la invención; un patógeno atenuado vivo que codifica una proteína de la invención y/o incluye una proteína de la invención; un patógeno inactivado incluye una proteína de la invención; o una composición tal como un liposoma o vacuna de subunidad que comprende una proteína de la invención. La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas inyectables que comprenden las composiciones.

VIH

5 La presente invención proporciona vacunas anti-VIH mejoradas utilizando una estrategia multifase para aumentar las respuestas inmunes celulares inducidas por inmunógenos de VIH. Se generaron secuencias consenso modificadas para los inmunógenos. También se describieron las modificaciones genéticas incluyendo optimización de codón, optimización de ARN, y la adición de una secuencia líder de inmunoglobina de alta eficacia para incrementar la inmunogenicidad de las construcciones. Los nuevos inmunógenos se han diseñado para provocar respuestas inmunes celulares más fuertes y más amplias que los inmunógenos optimizados por un codón correspondientes.

10 La SEQ ID NO:1 es una construcción de secuencia de ADN de la envoltura consenso del subtipo A. La SEQ ID NO:1 comprende la secuencia codificante para la secuencia de la vacuna de VIH que comprende una secuencia líder de IgE ligada a una secuencia consenso para la proteína de la envoltura del subtipo A. La SEQ ID NO:2 comprende la secuencia de aminoácidos para la construcción de secuencia de la vacuna del VIH que comprende una secuencia líder de IgE ligada a una secuencia consenso para la proteína de la envoltura del subtipo A. La secuencia líder de IgE es la SEQ ID NO:15. La SEQ ID NO:16 es la secuencia de la proteína de la envoltura consenso del subtipo A.

15 En algunas realizaciones, las vacunas de la invención incluyen preferentemente la SEQ ID NO:16, fragmento de la misma, una molécula de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO:16, o fragmentos de la misma. En algunas realizaciones, las vacunas de la invención incluyen preferentemente la SEQ ID NO:2 o una molécula de ácido nucleico que la codifica. En algunas realizaciones, las vacunas de la invención incluyen preferentemente la SEQ ID NO:1. Las vacunas de la presente invención incluyen preferentemente la secuencia líder de IgE SEQ ID NO:15 o la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la misma.

20 Los fragmentos de la SEQ ID NO:1 comprenden 1.890 o más nucleótidos; en algunas realizaciones, 1.980 o más nucleótidos; y en algunas realizaciones, 2.070 o más nucleótidos. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO:1 pueden comprender las secuencias codificantes para las secuencias líder de IgE. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO:1 no comprenden las secuencias codificantes para las secuencias líder de IgE.

25 Los fragmentos de la SEQ ID NO:2 comprenden 600 o más aminoácidos; en algunas realizaciones, 630 o más aminoácidos; en algunas realizaciones, 660 o más aminoácidos; y en algunas realizaciones, 690 o más aminoácidos.

35 Otros aspectos de la descripción

La SEQ ID NO:3 es una construcción de secuencia de ADN de la envoltura consenso del subtipo B. La SEQ ID NO:3 comprende la secuencia codificante para la secuencia de la vacuna del VIH que comprende una secuencia líder de IgE ligada a una secuencia consenso para la proteína de la envoltura del subtipo B. La SEQ ID NO:4 comprende la secuencia de aminoácidos para la construcción de secuencia de la vacuna del VIH que comprende una secuencia líder de IgE ligada a una secuencia consenso para la proteína de la envoltura del subtipo B. La secuencia líder de IgE es la SEQ ID NO:15. La SEQ ID NO:17 es la secuencia de la proteína de la envoltura consenso del subtipo B.

40 En algunos aspectos, las vacunas incluyen preferentemente la SEQ ID NO:17, fragmento de la misma, una molécula de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO:17, o fragmentos de la misma. En algunos aspectos, las vacunas incluyen preferentemente la SEQ ID NO:4 o una molécula de ácido nucleico que la codifica. En algunos aspectos, las vacunas incluyen preferentemente la SEQ ID NO:3. Las vacunas incluyen preferentemente la secuencia líder de IgE SEQ ID NO:15 o la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la misma.

45 Los fragmentos de la SEQ ID NO:3 pueden comprender 90 o más nucleótidos. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:3 pueden comprender 180 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 270 o más nucleótidos; en algunos aspectos 360 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 450 o más nucleótidos; en algunos aspectos 540 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 630 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 720 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 810 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 900 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 990 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.080 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.170 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.260 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.350 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.440 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.530 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.620 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.710 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.800 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.890 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.980 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 2.070 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 2.160 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 2.250 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 2.340 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 2.430 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 2.520 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 2.620 o más nucleótidos; y en algunos aspectos, 2.700 o más nucleótidos. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:3 pueden comprender las secuencias codificantes para las secuencias líder de IgE. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:3 no comprenden las secuencias codificantes para las secuencias líder de IgE. Los fragmentos pueden comprender 60 menos de 180 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 270 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 360 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 450 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 540 nucleótidos, en

algunos aspectos menos de 630 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 720 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 810 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 900 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 990 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.080 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.170 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.260 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.350 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.440 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.530 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.620 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.710 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.800 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.890 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.980 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 2.070 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 2.160 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 2.250 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 2.340 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 2.430 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 2.520 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 2.610 nucleótidos, y en algunos aspectos menos de 2.700 nucleótidos.

Los fragmentos de la SEQ ID NO:4 pueden comprender 30 o más aminoácidos. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:4 pueden comprender 60 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 90 o más aminoácidos; en algunos aspectos 120 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 150 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 180 o más aminoácidos; en algunos aspectos 210 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 240 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 270 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 300 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 330 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 360 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 390 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 420 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 450 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 480 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 510 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 540 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 570 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 600 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 630 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 660 o más aminoácidos; y en algunos aspectos, 690 o más aminoácidos. Los fragmentos pueden comprender menos de 90 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 120 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 150 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 180 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 210 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 240 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 270 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 300 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 330 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 360 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 390 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 420 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 450 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 480 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 540 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 600 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 660 aminoácidos, y en algunos aspectos menos de 690 aminoácidos.

La SEQ ID NO:5 es una construcción de secuencia de ADN de la envoltura consenso del subtipo C. La SEQ ID NO:5 comprende la secuencia codificante para la secuencia de la vacuna del VIH que comprende una secuencia líder de IgE ligada a una secuencia consenso para la proteína de la envoltura del subtipo C. La SEQ ID NO:6 comprende la secuencia de aminoácidos para la construcción de secuencia de la vacuna del VIH que comprende una secuencia líder de IgE ligada a una secuencia consenso para la proteína de la envoltura del subtipo C. La secuencia líder de IgE es la SEQ ID NO:15. La SEQ ID NO:18 es la secuencia de la proteína de la envoltura consenso del subtipo C.

En algunos aspectos, las vacunas incluyen preferentemente la SEQ ID NO:18, fragmento de la misma, una molécula de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO:18, o fragmentos de la misma. En algunos aspectos, las vacunas incluyen preferentemente la SEQ ID NO:6 o una molécula de ácido nucleico que la codifica. En algunos aspectos, las vacunas incluyen preferentemente la SEQ ID NO:5. Las vacunas incluyen preferentemente la secuencia líder de IgE SEQ ID NO:15 o la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la misma.

Los fragmentos de la SEQ ID NO:5 pueden comprender 90 o más nucleótidos. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:5 pueden comprender 180 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 270 o más nucleótidos; en algunos aspectos 360 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 450 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 540 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 630 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 720 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 810 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 900 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 990 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.080 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.170 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.260 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.350 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.440 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.530 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.620 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.710 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.800 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.890 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.980 o más nucleótidos; y en algunos aspectos, 2.070 o más nucleótidos. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:5 pueden comprender las secuencias codificantes para las secuencias líder de IgE. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:5 no comprenden las secuencias codificantes para las secuencias líder de IgE. Los fragmentos pueden comprender menos de 180 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 270 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 360 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 450 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 540 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 630 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 720 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 810 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 900 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 990 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.080 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.170 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.260 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.350 nucleótidos, en algunos

aspectos menos de 1.440 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.530 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.620 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.710 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.800 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.890 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.980 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.020 nucleótidos, y en algunos aspectos menos de 2.070 nucleótidos.

5 Los fragmentos de la SEQ ID NO:6 pueden comprender 30 o más aminoácidos. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:6 pueden comprender 60 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 90 o más aminoácidos; en algunos aspectos 120 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 150 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 180 o más aminoácidos; en algunos aspectos 210 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 240
10 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 270 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 300 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 330 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 360 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 390 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 420 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 450 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 480 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 510 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 540 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 570 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 600
15 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 630 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 660 o más aminoácidos; y en algunos aspectos, 690 o más aminoácidos. Los fragmentos pueden comprender menos de 90 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 120 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 150 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 180 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 210 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 240 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 270 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 300
20 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 330 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 360 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 390 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 420 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 450 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 480 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 540 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 600 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 660 aminoácidos, y en algunos aspectos menos de 690 aminoácidos.

25 La SEQ ID NO:7 es una construcción de secuencia de ADN de la envoltura consenso del subtipo D. La SEQ ID NO:7 comprende la secuencia codificante para la secuencia de la vacuna del VIH que comprende una secuencia líder de IgE ligada a una secuencia consenso para la proteína de la envoltura del subtipo D. La SEQ ID NO:8 comprende la secuencia de aminoácidos para la construcción de secuencia de la vacuna del VIH que comprende
30 una secuencia líder de IgE ligada a una secuencia consenso para la proteína de la envoltura del subtipo D. La secuencia líder de IgE es la SEQ ID NO:15. La SEQ ID NO:19 es la secuencia de la proteína de la envoltura consenso del subtipo D.

35 En algunos aspectos, las vacunas incluyen preferentemente la SEQ ID NO:19, fragmento de la misma, una molécula de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO:19, o fragmentos de la misma. En algunos aspectos, las vacunas incluyen preferentemente la SEQ ID NO:8 o una molécula de ácido nucleico que la codifica. En algunos aspectos, las vacunas incluyen preferentemente la SEQ ID NO:7. Las vacunas incluyen preferentemente la secuencia líder de IgE SEQ ID NO:15 o la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la misma.

40 Los fragmentos de la SEQ ID NO:7 pueden comprender 90 o más nucleótidos. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:7 pueden comprender 180 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 270 o más nucleótidos; en algunos aspectos 360 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 450 o más nucleótidos; en algunos aspectos 540 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 630 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 720 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 810 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 900 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 990 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.080 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.170 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.260 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.350 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.440 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.530 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.620 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.710 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.800 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.890 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.980 o más nucleótidos; y en algunos aspectos, 2.070 o más nucleótidos; y en algunos aspectos, 2.140 o más nucleótidos. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:7 pueden comprender las secuencias codificantes para las secuencias líder de IgE. En algunos
45 aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:7 no comprenden las secuencias codificantes para las secuencias líder de IgE. Los fragmentos pueden comprender menos de 180 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 270 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 360 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 450 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 540 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 630 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 720 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 810 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 900 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 990 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.080 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.170 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.260 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.350 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.440 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.530 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.620 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.710 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.800 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.890 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.980 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.020 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 2.070 nucleótidos y en algunos aspectos menos de 2.140 nucleótidos.

65 Los fragmentos de la SEQ ID NO:8 pueden comprender 30 o más aminoácidos. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:8 pueden comprender 60 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 90 o más

aminoácidos; en algunos aspectos 120 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 150 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 180 o más aminoácidos; en algunos aspectos 210 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 240 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 270 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 300 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 330 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 360 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 390 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 420 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 450 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 480 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 510 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 540 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 570 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 600 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 630 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 660 o más aminoácidos; y en algunos aspectos, 690 o más aminoácidos. Los fragmentos pueden comprender menos de 90 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 120 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 150 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 180 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 210 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 240 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 270 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 300 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 330 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 360 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 390 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 420 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 450 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 480 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 540 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 600 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 660 aminoácidos, y en algunos aspectos menos de 690 aminoácidos.

La SEQ ID NO:9 es una construcción de secuencia de ADN de la envoltura consenso de Nef-Rev del subtipo B. La SEQ ID NO:9 comprende la secuencia codificante para la secuencia de la vacuna del VIH que comprende una secuencia líder de IgE ligada a una secuencia consenso para la proteína Nef-Rev del subtipo B. La SEQ ID NO:10 comprende la secuencia de aminoácidos para la construcción de secuencia de la vacuna del VIH que comprende una secuencia líder de IgE ligada a una secuencia consenso para la proteína Nef-Rev del subtipo B. La secuencia líder de IgE es la SEQ ID NO:15. La SEQ ID NO:20 es la secuencia consenso de la proteína Nef-Rev del subtipo B.

En algunos aspectos, las vacunas incluyen preferentemente la SEQ ID NO:20, fragmento de la misma, una molécula de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO:20, o fragmentos de la misma. En algunos aspectos, las vacunas incluyen preferentemente la SEQ ID NO:10 o una molécula de ácido nucleico que la codifica. En algunos aspectos, las vacunas incluyen preferentemente la SEQ ID NO:9. Las vacunas incluyen preferentemente la secuencia líder de IgE SEQ ID NO:15 o la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la misma.

Los fragmentos de la SEQ ID NO:9 pueden comprender 90 o más nucleótidos. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:9 pueden comprender 180 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 270 o más nucleótidos; en algunos aspectos 360 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 450 o más nucleótidos; en algunos aspectos 540 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 630 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 720 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 810 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 900 o más nucleótidos; y en algunos aspectos, 990 o más nucleótidos; en algunos aspectos. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:9 pueden comprender las secuencias codificantes para las secuencias líder de IgE. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:9 no comprenden las secuencias codificantes para las secuencias líder de IgE. Los fragmentos pueden comprender menos de 180 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 270 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 360 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 450 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 540 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 630 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 720 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 810 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 900 nucleótidos, y en algunos aspectos menos de 990 nucleótidos.

La SEQ ID NO:11 es una secuencia de ADN consenso de Gag de la construcción de secuencia del ADN del subtipo A, B, C y D. La SEQ ID NO:11 comprende la secuencia codificante para la secuencia de la vacuna del VIH que comprende una secuencia líder de IgE ligada a una secuencia consenso para la proteína del subtipo A, B, C y D consenso Gag. La SEQ ID NO:12 comprende la secuencia de aminoácidos para la construcción de secuencia de la vacuna del VIH que comprende una secuencia líder de IgE ligada a una secuencia consenso para la proteína del subtipo A, B, C y D Gag. La secuencia líder de IgE es la SEQ ID NO:15. La SEQ ID NO:21 es la secuencia de la proteína del subtipo A, B, C y D Gag consenso.

En algunos aspectos, las vacunas incluyen preferentemente la SEQ ID NO:21, fragmento de la misma, una molécula de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO:21, o fragmentos de la misma. En algunos aspectos, las vacunas incluyen preferentemente la SEQ ID NO:12 o una molécula de ácido nucleico que la codifica. En algunos aspectos, las vacunas incluyen preferentemente la SEQ ID NO:11. Las vacunas incluyen preferentemente la secuencia líder de IgE SEQ ID NO:15 o la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la misma.

Los fragmentos de la SEQ ID NO:11 pueden comprender 90 o más nucleótidos. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:11 pueden comprender 180 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 270 o más nucleótidos; en algunos aspectos 360 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 450 o más nucleótidos; en algunos aspectos 540 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 630 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 720 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 810 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 900 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 990 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.080 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.170 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.260 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.350 o más nucleótidos; en

algunos aspectos, 1.440 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.530 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.620 o más nucleótidos; en algunos aspectos, 1.710 o más nucleótidos; y en algunos aspectos, 1.800 o más nucleótidos. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:11 pueden comprender las secuencias codificantes para las secuencias líder de IgE. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:11 no comprenden las secuencias codificantes para las secuencias líder de IgE. Los fragmentos pueden comprender menos de 180 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 270 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 360 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 450 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 540 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 630 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 720 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 810 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 900 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 990 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.080 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.170 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.260 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.350 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.440 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.530 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.620 nucleótidos, en algunos aspectos menos de 1.710 nucleótidos, y en algunos aspectos menos de 1.800 nucleótidos.

Los fragmentos de la SEQ ID NO:12 pueden comprender 30 o más aminoácidos. En algunos aspectos, los fragmentos de la SEQ ID NO:12 pueden comprender 60 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 90 o más aminoácidos; en algunos aspectos 120 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 150 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 180 o más aminoácidos; en algunos aspectos 210 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 240 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 270 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 300 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 330 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 360 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 390 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 420 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 450 o más aminoácidos; en algunos aspectos, 480 o más aminoácidos; y en algunos aspectos, 510 o más aminoácidos. Los fragmentos pueden comprender menos de 90 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 120 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 150 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 180 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 210 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 240 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 270 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 300 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 330 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 360 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 390 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 420 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 450 aminoácidos, en algunos aspectos menos de 480 aminoácidos, y en algunos aspectos menos de 510 aminoácidos.

Vacunas

La invención proporciona vacunas mejoradas al proporcionar proteínas y construcciones genéticas que codifican proteínas con epitopos que las hacen particularmente eficaces como inmunógenos frente a los que se pueden inducir respuestas inmunes. Por consiguiente, se pueden proporcionar vacunas para inducir una respuesta inmune terapéutica o profiláctica. En algunas realizaciones, los medios para administrar el inmunógeno es una vacuna de ADN, una vacuna recombinante, una vacuna de subunidad de proteína, una composición que comprende el inmunógeno, una vacuna atenuada o una vacuna inactivada. En algunas realizaciones, la vacuna comprende una combinación seleccionada de los grupos que consisten en: una o más vacunas de ADN, una o más vacunas recombinantes, una o más vacunas de subunidad de proteína, una o más composiciones que comprenden el inmunógeno, una o más vacunas atenuadas y una o más vacunas inactivadas.

Según algunas realizaciones de la invención, una composición según la invención es para su uso en la modulación de la actividad del sistema inmune del individuo y de ese modo aumentar la respuesta inmune. Cuando una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína es absorbida por las células del individuo la secuencia de nucleótidos se expresa en las células y la proteína de ese modo es administrada al individuo. Los aspectos de la invención proporcionan secuencias codificantes de la proteína o molécula de ácido nucleico tal como plásmidos, como parte de las vacunas recombinantes y como parte de las vacunas atenuadas, como proteínas aisladas o parte de proteínas de un vector.

Según algunos aspectos de la presente invención, se proporcionan composiciones que inmunizan profilácticamente y/o terapéuticamente un individuo.

Las vacunas de ADN se describen en las patentes americanas N.º 5.593.972, 5.739.118, 5.817.637, 5.830.876, 5.962.428, 5.981.505, 5.580.859, 5.703.055, 5.676.594, y las solicitudes de prioridad citadas en las mismas. Además de los protocolos de administración descritos en aquellas solicitudes, los métodos alternativos de administración de ADN se describen en las patentes americanas N.º 4.945.050 y 5.036.006.

La presente invención se refiere a vacunas vivas atenuadas mejoradas, vacunas inactivadas mejoradas y vacunas mejoradas que usan vectores recombinantes para administrar genes extraños que codifican antígenos y también vacunas de subunidad y glucoproteína. Ejemplos de vacunas vivas atenuadas, aquellas que usan vectores recombinantes para administrar antígenos extraños, vacunas de subunidad y vacunas de glucoproteína se describen en las patentes americanas N.º 4.510.245; 4.797.368; 4.722.848; 4.790.987; 4.920.209; 5.017.487; 5.077.044; 5.110.587; 5.112.749; 5.174.993; 5.223.424; 5.225.336; 5.240.703; 5.242.829; 5.294.441; 5.294.548; 5.310.668; 5.387.744; 5.389.368; 5.424.065; 5.451.499; 5.453.364; 5.462.734; 5.470.734; 5.474.935; 5.482.713; 5.591.439;

5.643.579; 5.650.309; 5.698.202; 5.955.088; 6.034.298; 6.042.836; 6.156.319 y 6.589.529.

5 Cuando se absorbe(n) por una célula, la(s) construcción(es) genética(s) se puede(n) continuar presente(s) en la célula como una molécula extracromosómica en funcionamiento y/o integrarse dentro del ADN cromosómico de la célula. El ADN se puede introducir en las células donde continúa como material genético separado en forma de un plásmido o plásmidos. Alternativamente, el ADN lineal que se puede integrar dentro del cromosoma se puede introducir dentro de la célula. Cuando se introduce el ADN en la célula, se pueden añadir reactivos que promueven la integración del ADN dentro de los cromosomas. Las secuencias de ADN que son útiles para promover la integración también pueden estar incluidas en la molécula de ADN. Alternativamente, el ARN se puede administrar a la célula. También se puede contemplar el proporcionar la construcción genética como un minicromosoma lineal que incluye un centrómero, telómeros y un origen de replicación. Las construcciones génicas pueden quedar como parte del material genético en los microorganismo vivos atenuados o vectores microbianos recombinantes que viven en las células. Las construcciones génicas pueden ser parte de los genomas de vacunas víricas recombinantes donde el material genético o bien se integra en el cromosoma de la célula o continúa extracromosómico. Las construcciones genéticas incluyen elementos reguladores necesarios para la expresión génica de una molécula de ácido nucleico. Los elementos incluyen: un promotor, un codón de iniciación, un codón de parada, y una señal de poliadenilación. Además, con frecuencia se requieren potenciadores para la expresión génica de la secuencia que codifica la proteína diana o la proteína de inmunomodulación. Es necesario que estos elementos estén ligados de manera operativa a la secuencia que codifica las proteínas deseadas y que los elementos reguladores estén de manera operativa en el individuo al que se administran.

25 En general se considera que los codones de iniciación y el codón de parada son parte de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína deseada. Sin embargo, es necesario que estos elementos sean funcionales en el individuo al que se administra la construcción génica. Los codones de iniciación y terminación deben estar en la estructura con la secuencia codificante.

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

30 Ejemplos de promotores útiles para poner en práctica la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna genética para seres humanos, incluyen pero no se limitan a promotores del virus de simio 40 (VS40), promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), virus de la inmunodeficiencia humana (MV) tal como el promotor de la repetición terminal larga (LTR) de VIB, virus de Moloney, ALV, Citomegalovirus (CMV) tal como el promotor temprano inmediato de CMV, virus de Epstein Barr (VEB), virus del sarcoma de Rous (VSR) así como promotores de los genes humanos tales como actina, miosina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humana y metalotioneína humana.

40 Ejemplos de señales de poliadenilación útiles para poner en práctica la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna genética para seres humanos, incluyen pero no se limitan a señales de poliadenilación de VS40 y señales de poliadenilación de LTR. En particular, se usa la señal de poliadenilación de VS40 que está en el plásmido pCEP4 (Invitrogen, San Diego CA), referida como señal de poliadenilación de VS40.

45 Además de los elementos reguladores requeridos para la expresión de ADN, también se pueden incluir otros elementos en la molécula de ADN. Tales elementos adicionales incluyen potenciadores. El potenciador se puede seleccionar del grupo que incluye pero no se limita a: actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humana y potenciadores víricos tales como aquellos de CMV, VSR y VEB.

50 Las construcciones genéticas se pueden proporcionar con origen de replicación mamífero para mantener la construcción extracromosómicamente y producir copias múltiples de la construcción en la célula. Los plásmidos pVAX1, pCEP4 y pREP4 de Invitrogen (San Diego, CA) contienen el origen de replicación del virus Epstein Barr y la región codificante del antígeno nuclear EBNA-1 la cual produce replicación episómica de alta copia sin integración.

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

mismos.

Se puede añadir un elemento adicional que sirve como diana para la destrucción celular si es deseable eliminar por cualquier razón células que reciben la construcción genética. Se puede incluir un gen de la timidina quinasa (tk) del herpes en una forma expresable en la construcción genética. El fármaco gangcyclovir se puede administrar al individuo y ese fármaco causará la muerte selectiva de cualquier célula que produce tk, así, produce los medios para la destrucción selectiva de las células con la construcción genética.

Para maximizar la producción proteica, se pueden seleccionar las secuencias reguladoras que están bien adaptadas para la expresión génica en las células en las que se administra la construcción. Además, se pueden seleccionar codones que son los más eficazmente transcritos en la célula. Un experto en la técnica puede producir construcciones de ADN que son funcionales en las células.

En algunas realizaciones, se pueden producir construcciones génicas en las que las secuencias codificantes para las proteínas descritas en el presente documento están ligadas al péptido señal de IgE. En algunas realizaciones, las proteínas descritas en el presente documento están ligadas al péptido señal de IgE.

En algunas realizaciones para las que se usa la proteína, por ejemplo, un experto en la técnica puede, usando técnicas bien conocidas, producir y aislar proteínas de la invención usando técnicas bien conocidas. En algunas realizaciones para las que se usa la proteína, por ejemplo, un experto en la técnica, usando técnicas bien conocidas, inserta moléculas de ADN que codifican una proteína de la invención en un vector de expresión comercialmente disponible para su uso en sistemas de expresión bien conocidos. Por ejemplo, el plásmido comercialmente disponible pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.) se puede usar para la producción de la proteína en *E. coli*. El plásmido comercialmente disponible pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.) se puede usar, por ejemplo, para la producción en cepas de levadura de *S. cerevisiae*. El sistema de expresión de baculovirus completo MAXBAC™ comercialmente disponible (Invitrogen, San Diego, Calif.) se puede usar, por ejemplo, para la producción en células de insecto. El plásmido comercialmente disponible pcDNA 1 o pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.) se puede usar, por ejemplo, para la producción en células mamíferas tales como las células de ovario de hámster chino. Un experto en la técnica puede usar estos vectores y sistemas de expresión comerciales u otros para producir proteína mediante técnicas rutinarias y materiales de partida fácilmente disponibles (Véase por ejemplo, Sambrook y col., "Molecular Cloning a Laboratory Manual", Segunda Ed. Cold Spring Harbor Press (1989)). Por tanto, las proteínas deseadas se pueden preparar en tanto sistemas procariotas como eucariotas, dando como resultado un espectro de formas procesadas de la proteína.

Un experto en la técnica puede usar otros vectores y sistemas de expresión comercialmente disponibles o producir vectores usando métodos bien conocidos y materiales de partida fácilmente disponibles. Los sistemas de expresión que contienen las secuencias control requeridas, tales como promotores y señales de poliadenilación, y preferentemente potenciadores son fácilmente disponibles y conocidos en la técnica para una diversidad de hospedadores. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., "Molecular Cloning a Laboratory Manual", Segunda Ed. Cold Spring Harbor Press (1989). Las construcciones genéticas incluyen la secuencia codificante de proteína ligada de manera operativa a un promotor que es funcional en la línea celular que se somete a transfección con las construcciones. Ejemplos de promotores constitutivos incluyen promotores de citomegalovirus o VS40. Ejemplos de promotores inducibles incluyen promotores del virus de leucemia mamaria de ratón o de metalotioneína. Los expertos en la técnica pueden producir fácilmente construcciones genéticas útiles para transfección con células con ADN que codifica la proteína de la invención a partir de los materiales de partida fácilmente disponibles. El vector de expresión que incluye el ADN que codifica la proteína se usa para transformar el hospedador compatible que, a continuación, se cultiva y mantiene bajo condiciones en las que se da lugar la expresión del ADN extraño.

La proteína producida se recupera del cultivo, o bien lisando las células o del medio de cultivo como sea apropiado y conocido por los expertos en la técnica. Un experto en la técnica puede, usando técnicas bien conocidas, aislarla la proteína que se produce usando tales sistemas de expresión. Los métodos de purificación de proteína a partir de fuentes naturales usando anticuerpos que se unen específicamente a una proteína específica como se describió anteriormente se pueden aplicar igualmente para purificar proteína producida por la metodología de ADN recombinante.

Además de producir proteínas por técnicas recombinantes, también se pueden emplear sintetizadores peptídicos automatizados para producir proteína esencialmente pura aislada. Tales técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica y son útiles si los derivados que tienen sustituciones no previstas en la producción de proteína codificada por ADN.

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

Las rutas de administración incluyen, pero no se limitan a, intramuscular, intranasalmente, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intravenosa, intraarterialmente, intraocularmente y oral así como tópicamente,

transdérmicamente, por inhalación o supositorio o a tejido mucoso tal como mediante lavado de tejido vaginal, rectal, uretral, bucal y sublingual. Las rutas preferidas de la administración incluyen la inyección intramuscular, intraperitoneal, intradérmica y subcutánea. Las construcciones genéticas se pueden administrar por medios que incluyen, pero no se limitan a, jeringuillas tradicionales, dispositivos de inyección sin agujas, o "pistolas de bombardeo de microproyectiles".

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se administra a las células junto con la administración de un potenciador de la función de polinucleótido o un agente facilitador de vacuna genética. Los potenciadores de la función de polinucleótido se describen en el documento americano de número de serie 5.593.972, 5.962.428 y la solicitud internacional de número de serie PCT/US94/00899 presentada el 26 de enero de 1994. Los agentes facilitadores de vacuna genética se describen en el documento americano de número de serie 021.579 presentado el 1 de abril de 1994. Los coagentes que se administraron junto con moléculas de ácido nucleico se pueden administrar como una mezcla con la molécula de ácido nucleico o se pueden administrar por separado simultáneamente, antes o después de la administración de las moléculas de ácido nucleico. Además, otros agentes que pueden funcionar como agentes de transfección y/o agentes de replicación y/o agentes inflamatorios y que se pueden administrar conjuntamente con un GVF incluyen factores del crecimiento, citoquinas y linfoquinas tales como α -interferón, gamma-interferón, GM-CSF, factor del crecimiento derivado de plaqueta (PDGF), TNF, factor del crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 y IL-15 así como factor del crecimiento de fibroblasto, agentes activos de superficie tales como complejos inmunoestimulantes (ISCOMS), adyuvante incompleto de Freund, análogo de LPS incluyendo monofosforil lípido A (WL), muramil péptidos, análogos de quinona y vesículas tales como escualeno y escualeno, y ácido hialurónico también se pueden administrar junto con la construcción genética. En algunas realizaciones, se puede usar una proteína de inmunomodulación como un GVF. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se proporciona en asociación con PLG para aumentar la administración/absorción.

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

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención se formulan según el modo de administración a usar. En casos donde las composiciones farmacéuticas son composiciones farmacéuticas inyectables, son estériles, libres de pirógeno y libres de partícula. Preferentemente se usa una formulación isotónica. En general, los aditivos para la isotonicidad pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos, se prefieren soluciones isotónicas tales como la solución salina tamponada con fosfato. Los estabilizadores incluyen gelatina y albúmina. En algunas realizaciones, se añade un agente de vasoconstricción a la fórmula.

Según algunas realizaciones de la invención, se proporcionan las composiciones de la invención para su uso en los métodos de inducción de respuestas inmunes. La vacuna puede ser una vacuna atenuada viva, basada en proteína, una vacuna celular, una vacuna recombinante o una vacuna de ácido nucleico o ADN. En algunas realizaciones, los métodos de inducción de una respuesta inmune en individuos frente a un inmunógeno, incluyendo métodos de inducción de respuestas inmunes mucosas, comprenden administrar al individuo uno o más de proteína CTACK, proteína TECK, proteína MEC y fragmentos funcionales de las mismas o secuencias codificantes expresables de las mismas en combinación con una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína de la invención y/o una vacuna recombinante que codifica proteína de la invención y/o una vacuna de subunidad de esa proteína de la invención y/o una vacuna atenuada viva y/o una vacuna inactivada. La una o más de proteína CTACK, proteína TECK, proteína MEC y fragmentos funcionales de las mismas se puede administrar antes de, simultáneamente con o después de la administración de la molécula de ácido nucleico aislada que codifica un inmunógeno; y/o vacuna recombinante que codifica un inmunógeno y/o vacuna de subunidad que comprende un inmunógeno y/o vacuna atenuada viva y/o vacuna inactivada. En algunas realizaciones, se administra al individuo una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una o más proteínas de las seleccionadas del grupo que consiste en: CTACK, TECK, MEC y fragmentos funcionales de las mismas.

60 Ejemplos

Ejemplo comparativo 1

MATERIALES Y MÉTODOS

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

Alineamiento múltiple. El procedimiento de alineamiento aplicado en el estudio filogenético incluía la aplicación de Clustal X (versión 1.81) (Thompson, J.D., y col. 1997. "The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools". *Nucleic Acids Research* 25:4.876-4.882). Los parámetros de alineamiento por pares se fijaron a la programación de "ajuste lento" dinámico, usando 10 como la penalización de abertura de hueco (*gap*) y 0,1 como la penalización de extensión de hueco. Los parámetros de alineamiento múltiple incluyen una penalización de extensión de hueco igual a 0,2.

Construcción de la secuencia consenso de la envoltura del VIH-1 subtipo B. La secuencia de nucleótidos consenso de la envoltura del VIH-1 subtipo B se obtuvo después de la realización del alineamiento múltiple y ajuste manual final menor. Se usaron secuencias de aminoácidos deducidas para guiar la introducción de huecos de alineamiento de manera que estaban insertados entre los codones. La secuencia de aminoácidos consenso se obtuvo traduciendo la secuencia de nucleótidos consenso.

Árbol filogenético. El método de vecino más cercano (NJ) se empleó para construir el árbol filogenético de aminoácidos usando el programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, D.L. 1999. PAUP* 4.0: "phylogenetic analysis using parsimony" (análisis filogenético usando parsimonia) (* y otros métodos), versión 4.0b2a. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.). Se usaron dos secuencias adicionales del subtipo D (K03454 y AAA44873) y dos secuencias del subtipo C (AAD12103 y AAD12112) como un grupo extraño para el enraizamiento (Kuiken, C., B.T. Korber, and R.W. Shafer. 2003. "HIV sequence databases". *AIDS Rev.* 5:52-61).

Modificaciones de la secuencia consenso de la envoltura del VIH-1 subtipo B. Se realizaron varias modificaciones después de obtener la secuencia de la envoltura consenso del VIH-1 subtipo B: se acortaron las regiones V1 y V2 altamente variables, se diseñó el bucle V3 para la utilización de CCR5, se separó la región cola citoplasmática del C-terminal, se añadieron una secuencia líder y una secuencia Kozak en dirección 5' al N-terminal, se realizó la optimización de codón y la optimización de ARN usando GeneOptimizer™ (GENEART, Alemania).

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

Se generó el inmunógeno del subtipo B primario (EK2P-B) a partir de un gen de la envoltura 6101 gp140 del aislado del subtipo B primario, sesgado por codón humano que era un regalo de M. Sidhm (Wyeth). Básicamente, el gen de envoltura 6101 optimizado se mutó separando la secuencia líder nativa y la cola citoplasmática. A continuación, la secuencia líder de IgE y la secuencia Kozak se introdujeron diseñando cebadores específicos directos e inversos: Env-Directo: 5'-GTGCTCCGCTAGCTTGTGGGTACAGTCTATTATGGGGTACC-3' (SEQ ID NO:13) Env-Inverso: 5'-GGTCCGATCCTTACTCCACCACTCTCCTTTTTGCC-3' (SEQ ID NO:14). El producto de PCR purificado se clonó en el vector plásmido pVAX, el cual también se volvió lineal con EcoRI y XbaI. Esta construcción se denominó pEK2P-B.

Expresión y reactividad *in vivo* de EY2E1-B con anticuerpos monoclonales. Se sometieron a transfección células de rhabdomyosarcoma (RD) humano (2×10^6) en placas de 60 mm con 30 μ g de plásmidos pEY2E1-B y pEK2P-B usando reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche, Alemania), respectivamente. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se lavaron tres veces con 1xPBS y se sometieron a lisis en 150 μ l de tampón de lisis (Cell Signaling Technology). Los lisados de proteína totales (50 μ g) se separaron en fracciones sobre un gel de SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham). Los análisis de inmunotransferencia se realizaron con un anticuerpo monoclonal específico a envoltura 2G12 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, USA) y un anticuerpo anti-actina monoclonal (Sigma-Aldrich) y se visualizaron con anti-IgG humana de cabra conjugado con HRP (Sigma-Aldrich) usando un sistema de análisis de transferencia Western ECL™ (Amersham). La actina se usó como control de carga para la transferencia Western.

Para detectar la reactividad de EY2E1-B con anticuerpos monoclonales, los lisados de proteína totales de la transfección (100 μ g) se inmunoprecipitaron con 5 μ g de anticuerpos monoclonales específicos a la envoltura incluyendo 2G12, 4G10 e ID6 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, USA). La misma cantidad de lisados de proteína totales de las células transfectadas con vector vacío pVAX se usó como control negativo. Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron en fracciones sobre un gel de SDS-PAGE y se detectaron por transferencia Western como se describió anteriormente.

Ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta para confirmar la expresión de los genes de EY2E1-B y EK2P-B. Las células de rhabdomyosarcoma (RD) humano se colocaron en placas en portaobjetos con cámara de cultivo de tejido (BD Biosciences), a una densidad para obtener confluencia

del 60 a 70 % el día siguiente en medio DMEM completo con FBS al 10 % (GIBCO) y dejar que se adhieran durante la noche. Al día siguiente las células se sometieron a transfección con pEY2E1-B, pEK2P-B y el plásmido control pVAX (1 µg/pocillo) usando el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche) según las instrucciones del fabricante. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se lavaron las células dos veces con 1XPBS frío y se fijaron sobre portaobjetos usando metanol durante 15 min. Tras la separación de los disolventes residuales de los portaobjetos, las células se incubaron con F105 monoclonal anti-env de VIH-1 de ratón (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, USA) durante 90 min. A continuación, los portaobjetos se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con TRITC (Sigma-Aldrich) durante 45 min. Se añadió hidrocloreuro de 4',6-diamido-2-fenilindol (Sigma-Aldrich) a la solución de anticuerpo secundario a los núcleos de contratincción para mostrar los núcleos del número total de las células disponibles en el campo dado. Los portaobjetos se montaron con medio de montaje que contenía reactivo antidecoloración (Molecular Probes). Las imágenes se analizaron usando el programa Phase 3 Pro para microscopio fluorescente (Media Cybernetics).

Determinación de anticuerpo específico a envoltura. La medición de los anticuerpos IgG específicos a la envoltura se realizó por ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima) en tanto ratones inmunizados como control. Se cubrieron placas Nunc-Immuno™ (Nalge Nunc International, Rochester, NY) con 1 µg/ml de glucoproteína del VIH-1 IIB recombinante del clado B soluble gp160 (Immuno Diagnostics, MA), proteína de la envoltura primaria del clado A/E del VIH-1 93TH975 gp120 y proteína de la envoltura primaria del clado C del VIH-1 96ZM651 gp120 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, USA), respectivamente, y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas se bloquearon con BSA al 3 % en PBST (1xPBS+Tween-20 al 0,05 %) durante 1 h a 37 °C. A continuación, las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con los sueros de ratón específicos, se diluyeron con BSA al 3 % en PBST durante la noche a 4 °C, seguido de incubación con una dilución 1/10.000 de anti-IgG de ratón de cabra conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) durante 1 h a 37 °C. La reacción se desarrolló con el sustrato TMB (3, 3µ, 5, 5µ - tetrametilbenzidina) (Sigma-Aldrich). La reacción se paró con 100 µl de ácido sulfúrico 2,5 M por pocillo y las placas se leyeron en el lector de placa EL808 (Biotech Instrument Inc.) a DO de 450 nm.

Inmunización de ratones. Se compraron ratones BALB/c de 4 a 6 semanas de vida femeninos en "The Jackson Laboratory", Bar Harbor, ME. Las parejas de cría de ratones B6.Cg-Tg (HLA-A/H2-D)2Eng/J transgénicos se compraron en "The Jackson Laboratory" y fueron criados por el Dr. Michelle Kutzler en nuestro laboratorio. Los ratones transgénicos expresan un gen de MHC de clase I híbrido interespecie, AAD, el cual contiene los dominios alfa-1 y alfa-2 del gen HLA-A2.1 humano y los dominios transmembrana alfa-3 y citoplasmáticos del gen H-2Dd de ratón, bajo la dirección del promotor de HLA-A2.1 humano. La expresión del dominio alfa-3 de ratón aumenta la respuesta inmune en este sistema. En comparación con HLA-A2.1 no modificado, la molécula de MHC clase I HLA-A2.1/H2-Dd medió la selección positiva eficaz de linfocitos T de ratón para proporcionar un repertorio de linfocito T más completo capaz de reconocer los péptidos presentados por las moléculas HLA-A2.1 clase I. Los epítotos peptídicos presentados y reconocidos por linfocitos T de ratón en el contexto de la molécula HLA-A2.1 clase I son los mismos que aquellos presentados en seres humanos HLA-A2.1+. Los ratones transgénicos de 4 a 6 semanas de vida femeninos se usaron para el estudio adicional descrito más adelante. Su cuidado era de acuerdo con las directrices de los "National Institutes of Health" y el "University of Pennsylvania Institutional Care and Use Committee" (IACUC). Cada ratón se inmunizó intramuscularmente tres veces, cada una de 100 µg de ADN a intervalos bisemanales. Hay tres ratones en cada grupo y el grupo control se vacunó con ADN de pVAX. Los ratones se sacrificaron una semana después de la tercera inmunización y se extrajeron los bazo asépticamente. Las células del bazo se recogieron y se resuspendieron en tampón de lisis de GR para separar los eritrocitos. Después de la lisis, los esplenocitos del mismo grupo se agruparon y se resuspendieron en medio RPMI 1640 con FBS al 10 %. Las células se contaron y se prepararon para análisis.

Ensayo ELISpot de IFN-γ. Se usaron placas Multiscreen™ de 96 pocillos IP de alta unión a proteína (Millipore, Bedford, MA, USA). Las placas se cubrieron con mAc para IFN-γ de ratón (R&D Systems, Minneapolis, MN) diluido en 1xPBS, durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con PBS y, a continuación, se bloquearon durante 2 h a temperatura ambiente con 1xPBS complementado con BSA al 1 % y sacarosa al 5 %. Se añadieron esplenocitos de ratones por triplicado a un número de célula de entrada de 2x10⁵ células por pocillo resuspendidas en medio de cultivo completo (RPMI 1640 complementado con FBS al 10 % y anticuerpos). Seis conjuntos de péptidos conteniendo cada uno 15 restos de aminoácidos solapados por 11 aminoácidos que representan las secuencias consenso de proteína enteras del VIH-1 subtipo B, subtipo C, grupo M y las secuencias de proteína enteras de la envoltura del VIH-1 MN (un aislado del subtipo B), HIV-1 C.UY.01.TRA3011 y C.ZA.01.J54Ma (dos aislados del subtipo C) se obtuvieron del "NIH AIDS Research and Reference Reagent Program". Cada conjunto de péptidos de env se agruparon a una concentración de 2 µg/ml de péptido dentro de los 4 grupos como antígenos para la estimulación específica de la liberación de IFN-γ. La concavalina A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), a 5 g/ml, y el medio de cultivo completo se usaron como control positivo y negativo, respectivamente. Las placas se lavaron cuatro veces después de una incubación de 24 h a 37 °C, en un incubador de atmósfera de CO₂ al 5 %. A continuación, se añadió un anticuerpo de detección anti-IFN-γ de ratón biotinilado, y las placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron, y se siguió el desarrollo de color según las instrucciones del fabricante (ELISPOT Blue Color Module, R&D Systems, Minneapolis, MN). Las placas se secaron al aire y las manchas se contaron usando un sistema de lectura de ELISPOT automatizado (CTL Analyzers, Cleveland, OH) con el programa informático ImmunoSpot®. El número promedio de células formadoras de mancha (SFC) se ajustó a 1x10⁶

esplenocitos para la presentación de datos. El ensayo ELISpot se repitió tres veces en tres experimentos separados.

Estudio de agotamiento de linfocito T CD8+. Los linfocitos con CD8 se sometieron a agotamiento de esplenocitos usando perlas inmunomagnéticas revestidas con anticuerpo para CD8 (DynaL Biotech Inc., Lake Success, NY) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después del agotamiento de los linfocitos T CD8+, se realizó el ensayo ELISpot de IFN- γ como se describió anteriormente.

Estudio de mapeo de epítipo. Para mapear los epítipos reactivos, se agruparon dos conjuntos de péptidos que contenían 15 restos de aminoácidos que se solapaban por 11 aminoácidos que representaban las proteínas de la envoltura enteras del consenso del VIH-1 subtipo B y VIH-1 MN en 29 grupos de 14 a 15 péptidos/por grupo, respectivamente, y se realizó el ensayo ELISpot de IFN- γ como se describió anteriormente. Estos conjuntos diferentes de 29 estimuladores agrupados se usaron en un ensayo de matriz que facilita el mapeo de epítipo.

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

RESULTADOS

Construcción y diseño de un nuevo gen de la envoltura basado en consenso transmisor temprano del subtipo B. La secuencia consenso del VIH-1 subtipo B se generó a partir de 42 secuencias del subtipo B recuperadas del GenBank. Como se resumen en la Fig. 1, se llevaron a cabo varias modificaciones después de la generación de la secuencia consenso. En resumen, para producir una versión trópica de CCR5 de la envoltura del VIH-1 que imitaba los virus mucosamente transmitidos, se diseñaron seis aminoácidos importantes en el bucle V3 según las secuencias de los aislados transmisores tempranos. Además, diez aminoácidos en el bucle V1 y un aminoácido en el bucle V2 también se suprimió de la secuencia consenso. Una secuencia líder altamente eficaz se fusionó en la estructura en dirección 5' del codón de inicio para facilitar la expresión. El dominio de transmembrana se mantuvo intacto para facilitar la expresión de superficie y el sitio de escisión se mantuvo intacto para obtener apropiado plegamiento y la escisión de proteinasa hospedadora de la proteína de la envoltura. Se separó la cola citoplasmática para prevenir el reciclado de la envoltura y para promover expresión de superficie más estable y mayor (Berlioz-Torrent, C., y col. 1999. "Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins". *J. Virol.* 73:1.350-1.359; Bultmann, A., y col. 2001. "Identification of two sequences in the cytoplasmic tail of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that inhibit cell surface expression". *J. Virol.* 75:5.263-5.276). Además, para tener un nivel mayor de expresión, el uso de codón de este gen se adaptó al sesgo de codón de genes de *Homo sapiens* (Andre, S., y col. B. 1998. "Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage". *J. Virol.* 72:1.497-503; Deml, L., y col. 2001. "Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 gag protein". *J. Virol.* 75:10.991-11.001). Además, también se realizó la optimización de ARN (Schneider, R., y col. 1997. "Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation". *J. Virol.* 71:4.892-4.903): se evitaron las regiones de muy alto (>80 %) o muy bajo (<30 %) contenido en GC y los motivos de secuencia de cis-actuación tales como cajas TATA, los sitios chi y los sitios de entrada ribosómica. El gen EY2E1-B modificado por ingeniería sintético se construyó y era de 2.734 pb de longitud. El gen EY2E1-B se subclonó en pVAX en los sitios BamHI y NotI para estudio adicional.

Análisis filogenético. Para valorar la distribución de la distancia desde una secuencia del subtipo B de envoltura aleatoriamente muestreada a la secuencia de EY2E1-B, se realizó un análisis filogenético. Como se muestra en la Fig. 2, había una relativa cercanía observada de la secuencia de EY2E1-B a todas las secuencias muestreadas. La secuencia de EY2E1-B, cuando se compara con la secuencia de EK2P-B de aislado primario, tiene distribuciones comparables de puntuaciones de similitud (Tabla 1). La puntuación de porcentaje de similitud promedio para EY2E1-B era de 85,7 %, mientras que era 79,4 % para EK2P-B.

Tabla 1

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

Tabla 1. El promedio y el rango de puntuaciones de porcentaje de similitud entre los candidatos de vacuna de envoltura potenciales y un alineamiento de secuencias de la envoltura del subtipo B.

Expresión *in vivo* y determinación antigénica de EY2E1-B. Para ensayar la expresión *in vivo* de pEY2E1-B y pEK2P-B, se sometieron a transfección células RD con estos plásmidos como se describe en la sección de Materiales y métodos. Se extrajeron las proteínas totales de los lisados celulares después de la transfección y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpo monoclonal específico a envoltura 2G12 mencionado en la sección de

Materiales y métodos para detectar la expresión de pEY2E1-B. Los resultados de la transferencia Western indicaron que estas dos construcciones expresaban proteína de la envoltura (Fig. 3A). La proteína de la envoltura detectada era de aproximadamente 120 KD. La Tabla 2 muestra una comparación de pEY2E1-B y pEK2P-B.

5

Tabla 2

	Consenso/Primario	Transmisor temprano	Codón-optimizado	ARN-optimizado	IgELS	Cola citoplasmática
EY2E1-B	Consenso	Sí	Sí	Sí	Sí	No
EK2P-B	Primario	No	Sí	Sí	Sí	No

10

15

Para determinar los epítomos antigénicos, se inmunoprecipitaron las proteínas de la envoltura expresadas a partir de los lisados de célula de RD con tres anticuerpos específicos a gp120 diferentes 2G12, 4G10 e ID6. Después de la inmunoprecipitación, la transferencia Western se realizó para detectar las proteínas inmunoprecipitadas. Nuestros resultados mostraron que el inmunógeno sintético se podía unir a los anticuerpos 2G12 e ID6, pero no a 4G10. Puesto que el anticuerpo 2G12 neutraliza una gran variedad de aislados primarios y reacciona con un epítomo gp120 dependiente de carbohidrato y conformacional, y el anticuerpo ID6 se une a gp120 y gp160 y se dirige frente a los primeros 204 aminoácidos de gp120, nuestros resultados sugirieron que el inmunógeno EY2E1-B modificado por ingeniería sintético podría ser capaz de plegarse dentro de una conformación relativamente nativa y conservar algunos epítomos antigénicos nativos. Además, puesto que el anticuerpo 4G10 es un anticuerpo monoclonal de VIH-1 LAI/BRU V3 que reconoce LAI gp160, una cepa adaptada del linfocito T, nuestros datos también sugirieron que esta envoltura sintética no utilizaría el correceptor CXCR4.

20

25

Para confirmar más la expresión y determinar los epítomos antigénicos, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta usando células de RD transfectadas. Se observó alta expresión específica bajo microscopio fluorescente en las células transfectadas con pEY2E1-B y pEK2P-B. El F105 monoclonal de env del VIH-1 que reacciona con un epítomo de gp120 discontinuo, o conformacional, se usa en el ensayo. Como se indica en la Fig. 3B, las células transfectadas que expresan las proteínas Env mostraron la fluorescencia de rodamina típica, sugiriendo de nuevo que se expresaba la proteína sintética y tenía una conformación relativamente nativa. Como control, la expresión no se detectó en células de RD transfectadas con pVAX.

30

35

Inducción de la respuesta humoral. Para determinar si el inmunógeno sintético podría provocar respuesta a anticuerpo específico a envoltura de alta titulación, se recogieron sueros de ratones BalB/C inmunizados con pVAX, pEY2E1-B y pEK2P-B, y se realizó ELISA. Como se muestra en la Fig. 4A, observamos el nivel relativamente mayor de anticuerpo específico a la envoltura del clado B con sueros recogidos de ratones inmunizados con pEY2E1-B en comparación con estos en ratones inmunizados con pEK2P-B. Por el contrario, los ratones con vector solo no desarrollaron respuestas a anticuerpo específicas. Sin embargo, no hubo ninguna respuesta de anticuerpo detectable frente a proteínas del clado A/E y clado C en tanto ratones inyectados con pEY2E1-B como con pEK2P-B (Fig. 4B y AC), indicando que aunque el inmunógeno basado en consenso sintético tiene una conformación relativamente nativa y conserva epítomos antigénicos nativos, no puede ser capaz de inducir amplias respuestas inmunes de anticuerpo de clado cruzado.

40

45

50

55

Respuestas inmunes celulares fuertes y amplias medidas por ELISpot. Se inmunizaron los ratones BalB/C con pEY2E1-B y pEK2P-B y se realizó el análisis ELISpot para determinar el número de células secretoras de IFN- γ específico a antígeno en respuesta a cuatro grupos de péptidos de la proteína consenso del VIH-1 subtipo B (Fig. 5A). La magnitud de la respuesta medida por el número de unidades formadoras de mancha (SFU) por millón de células osciló de 27,5 a 520 en ratones vacunados con pEY2E1-B. En comparación, los esplenocitos de ratones vacunados con pEK2P-B solamente mostraron el intervalo de manchas de 2 a 237,5 ($p < 0,05$). La frecuencia aditiva de SFU/por millón de esplenocitos para todos los cuatro grupos en ratones inmunizados con pEY2E1-B era de 1.976,25+260, mientras que el número de SFU/por millón de células en ratones inmunizados con pEK2P-B era de 519+45. Las células de ratones inmunizados con vector pVAX se usaron como control negativo, mostrando solamente 60+5 SFU/por millón de esplenocitos para los grupos de péptidos B de la envoltura consenso ($p < 0,05$). Observamos resultados similares en tres estudios separados. Por lo tanto, la construcción pEY2E1-B es hasta cuatro veces más potente en conducir respuestas inmunes mediadas por célula. También determinamos si los linfocitos CD8+ eran responsables de la secreción de IFN- γ detectada en ratones BalB/C inmunizados con pEY2E1-B. Como se muestra en la Fig. 5B, el número de SFU/por millón de células se redujo a 127,5+11 después del agotamiento de CD8+, indicando que había aproximadamente 90 % de descenso en las frecuencias de células productoras de IFN- γ observadas por ELISpot de agotamiento de linfocito T CD8+. La producción de IFN- γ inducida por pEY2E1-B se media principalmente por linfocitos T CD8+.

60

Además, para modelar las respuestas inmunes del linfocito T humano a antígenos presentados a HLA-A2 e identificar aquellos antígenos, realizamos el mismo ensayo ELISpot anteriormente mencionado usando ratones HLA-A2.1/H2-Dd transgénicos. Como se muestra en la Fig. 5C, la frecuencia aditiva de SFU/por millón de esplenocitos para todos los cuatro grupos en ratones transgénicos inmunizados con PEYE1-B era de 2.362+257, mientras que el número de SFU/por millón de células en ratones transgénicos inmunizados con pEK2P-B era solamente de 493+57. Estos resultados indicaron que la construcción pEY2E1-B es hasta cuatro veces más potente en conducir respuestas inmunes mediadas por célula en los ratones transgénicos. Los datos de ELISpot después del

agotamiento de CD8 sugirieron que la producción de IFN- γ inducida por pEY2E1-B está principalmente mediada por linfocitos T CD8+ (Fig. 5D).

Además, estábamos interesados en detallar más las respuestas inmunes celulares que observábamos en el ensayo ELISpot. Por consiguiente, un conjunto adicional del ensayo ELISpot se realizó frente a genotecas de péptidos que abarcaban la proteína de la envoltura del subtipo B consenso. Un conjunto completo de péptidos 15-mero solapados por 11 aminoácidos, los cuales comprendían la proteína de la envoltura consenso del subtipo B, se usó para realizar este estudio de mapeo. El estudio ilustró que no había epítipo dominante claro inducido por la envoltura sintética. Sin embargo, el análisis ELISpot de IFN- γ de esplenocitos derivados de ratones BalB/C vacunados con pEY2E1-B reveló que había 18 grupos de los 29 grupos que mostraban más de 50 manchas, mientras que había solamente 6 grupos en ratones BalB/C vacunados con pEK2P-B (Fig. 5E). Estos resultados ilustraron que hay un incremento significativo en la amplitud y magnitud de las respuestas inmunes celulares inducidas por el inmunógeno EY2E1-B.

Respuestas inmunes celulares de reacción cruzada fuertes inducidas por pEY2E1-B. Para determinar si el inmunógeno EY2E1-B podría inducir respuestas inmunes celulares amplias y de reacción cruzada, se realizó ELISpot de IFN- γ tanto en ratones BalB/C como transgénicos HLA-A2 usando péptidos de la envoltura del VIH-1 grupo M, subtipo C consenso, VIH-1 MN (aislado del subtipo B), del HIV-1 C.UY.01.TRA3011 y C.ZA.01.J54Ma (dos aislados del subtipo C). Estos ensayos determinarán además si los resultados observados en la Fig. 5A, C y E solo están relacionados con las dianas peptídicas o realmente son debido al incremento en la amplitud inmune. Como se muestra en la Fig. 6A, el número aditivo de SFU (por millón de esplenocitos frente a cuatro grupos de péptidos de la envoltura del VIH-1 MN en ratones BalB/C vacunados con pEY2E1-B era de 1.855+215,8, lo cual era aproximadamente dos veces más que aquellos en ratones BalB/C inmunizados con pEK2P-B (SFU/por millón de esplenocitos era 700+168,2), indicando que pEY2E1-B tenía reactividad cruzada más fuerte que pEK2P-B dentro del subtipo B. Los números de manchas de IFN- γ en respuesta a la estimulación con cuatro grupos de péptidos de la envoltura consenso del VIH grupo M (Fig. 6B) y subtipo C (Fig. 6C) en ratones BalB/C inmunizados con pEY2E1-B era de 1.150+191,3 y 715+116,1, respectivamente. En comparación con los números de manchas frente a los péptidos del grupo M y subtipo C los cuales eran de 635+152,3 y 345+82,3 en ratones BalB/C vacunados con pEK2P-B, estos datos ilustran que las respuestas inmunes de clado cruzado provocadas por pEY2E1-B es aproximadamente 45 % más fuerte que aquellas inducidas por pEK2P-B en ratones BalB/C.

Importantemente, observamos respuestas inmunes celulares de reacción cruzada mucho más fuertes inducidas por pEY2E1-B en ratones transgénicos (Fig. 6F-J). El número aditivo de SFU/por millón de esplenocitos frente a cuatro grupos de péptidos de la envoltura del VIH-1 MN en ratones transgénicos vacunados con pEY2E1-B era de 1.087+153, lo cual era aproximadamente tres veces más que aquellos en ratones HLA-A2 inmunizados con pEK2P-B (SFU/por millón de esplenocitos era 316+63) (Fig. 6F), indicando que pEY2E1-B podría también provocar reactividad cruzada más fuerte que pEK2P-B dentro del subtipo B en ratones transgénicos. Los números de manchas de IFN- γ en respuesta a la estimulación con cuatro los grupos de péptidos de la envoltura consenso del VIH grupo M (Fig. 6G) y subtipo C (Fig. 6H) en ratones transgénicos inmunizados con pEY2E1-B era de 2.116+216 y 893+154, respectivamente. En comparación con los números de manchas frente a los péptidos del grupo M y subtipo C que eran de 473+50 y 266+55 en ratones transgénicos vacunados con pEK2P-B, estos datos indicaron que las respuestas inmunes de clado cruzado provocadas por pEY2E1-B es aproximadamente tres a cuatro veces más fuerte que aquellas inducidas por pEK2P-B en ratones transgénicos. Además, dos conjuntos de péptido aislados del subtipo C que deberían servir como control estricto para evaluar la amplitud y la reactividad cruzada alcanzada por otros conjuntos de péptido se usaron para determinar además las respuestas inmunes de clado C cruzado. Aunque no había demasiadas diferencias de reactividad cruzada frente a estos dos conjuntos de aislado del subtipo C provocados por pEY2E1-B y pEK2P-B en ratones BalB/C (Fig. 6D y E), la reactividad de clado cruzado frente a estos dos conjuntos de aislado del subtipo C inducidos por pEY2E1-B es aproximadamente tres veces más fuerte que aquellas inducidas por pEK2P-B (Fig. 6I y J). Los números de manchas frente a péptidos C.ZA.01.J54Ma y C.UY.01.TRA3011 eran de 1.080+206 y 890+150 en ratones transgénicos vacunados con pEY2E1-B, mientras que los números eran solamente 305+38 y 310+62 en ratones transgénicos vacunados con pEK2P-B.

Finalmente, determinamos si había también un incremento en la amplitud de las respuestas inmunes celulares de reacción cruzada frente a dianas específicas a subtipo inducidas por el inmunógeno EY2E1-B detallando las respuestas inmunes celulares frente a VIH-1 MN observadas anteriormente tanto en ratones transgénicos BalB/C como HLA-A2. Se realizó un ensayo de mapeo de epítipo frente a la genoteca de péptidos que abarcaban la proteína de la envoltura del subtipo B MN. Los resultados sugirieron que no había epítipo dominante claro inducido por la envoltura sintética en ambas cepas de ratón. Sin embargo, el análisis ELISpot de IFN- γ de esplenocitos derivados de los ratones BalB/C vacunados con pEY2E1-B revelaron que había 14 grupos de los 29 grupos que mostraban más de 50 manchas, mientras que había solamente 9 grupos en ratones BalB/C vacunados con pEK2P-B (Fig. 7A). Igualmente, en ratones transgénicos, había 18 grupos de los 29 grupos que mostraban más de 50 manchas en ratones transgénicos inmunizados con pEY2E1-B, mientras que había solamente 6 grupos en ratones transgénicos vacunados con pEK2P-B (Fig. 7B). Estos datos indicaron que hay un incremento significativo en la amplitud y magnitud de las respuestas inmunes celulares de reacción cruzada inducidas por el inmunógeno EY2E1-B tanto en ratones BalB/C como transgénicos HLA-A2.

CONCLUSIÓN

Por todo el mundo los intentos de vacuna de ADN del VIH-1 se han guiado por el principio de que las respuestas de linfocito T específico a VIH pueden proporcionar alguna contribución a la protección de la infección o control de la replicación después de la infección. Las vacunas de ADN pueden impactar en la replicación vírica aunque en general no son tan potentes en la inducción inmune como los vectores víricos vivos atenuados (Almond, N., y col. 1995. "Protection by attenuated simian immunodeficiency virus in macaques against challenge with virus-infected cells". *Lancet* 345:1.342-1.344; Berman, P.W., y col. 1996. "Protection of MN-rgp120-immunized chimpanzees from heterologous infection with a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1". *J. Infect. Dis.* 173:52-9; Boyer, J., y col. 1997. "Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination". *Nat. Med.* 3:526-532; Daniel, M.C., y col. 1992. "Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene". *Science* 258:1.938-1.941). Por lo tanto, las estrategias reivindicadas en la mejora de la amplitud y magnitud de las respuestas inmunes celulares son importantes. La presente invención proporciona un nuevo antígeno que usa varios rasgos de inmunógenos que se han publicado en la bibliografía como planteamientos separados, pero previamente no se han reunido juntos en una modalidad de vacuna. Como prueba del concepto, se desarrolló un inmunógeno de la envoltura basado en consenso modificado por ingeniería sintético y se comparó con un inmunógeno de secuencia primaria optimizada para la inducción de respuestas inmunes mediadas por célula. Los datos de expresión mostraron que este nuevo gen de la envoltura modificado por ingeniería se podía expresar eficazmente en líneas celulares mamíferas aunque los niveles de expresión de estos dos inmunógenos eran muy similares (Fig. 3A). Observamos en los estudios de inmunogenicidad que las respuestas inmunes celulares inducidas por este inmunógeno funcional presentaron diversidad incrementada y magnitud comparada con la vacuna de envoltura primaria. Los datos del mapeo de epítipo obtenidos en tanto ratones BalB/C como transgénicos HLA-A2 demostraron que esta mejora de diversidad y magnitud se mantenía a través de estos haplotipos. Para confirmar más este descubrimiento, también desarrollamos un inmunógeno de la envoltura del subtipo C basado en consenso y se comparó con un inmunógeno del subtipo C primario, de nuevo el inmunógeno de la envoltura del subtipo C basado en consenso sintético presentó diversidad y magnitud aumentadas de las respuestas inmunes celulares en comparación con el inmunógeno C primario (datos no publicados).

Desde el punto de vista de la estrategia de diseño de vacuna, la homología de secuencia entre el candidato de vacuna y el virus de infección o exposición puede ser una consideración importante. Un planteamiento eficaz para minimizar el grado de la desemejanza de secuencia entre una cepa de vacuna y los virus circulantes actuales es crear secuencias artificiales que son "centrales" a estos virus. Una estrategia para diseñar tal secuencia es usar una secuencia consenso derivada del aminoácido más común en cada posición en un alineamiento. En este estudio, desarrollamos una vacuna de envoltura del subtipo B basada en consenso y pensamos que este inmunógeno sintético tendría mayor reactividad cruzada. Nuestros resultados mostraron que había una diversidad de respuestas inmunes celulares inducidas por la vacuna de pEY2E1-B. Los resultados del mapeo de péptido en tanto ratones Balb/c como transgénicos también indicaron que el inmunógeno EY2E1-B amplió las respuestas inmunes. Además, los resultados del estudio de las respuestas inmunes celulares de reacción cruzada indicaron que pEY2E1-B podía provocar respuestas inmunes celulares de reacción cruzada más fuertes y amplias. Por lo tanto, los inmunógenos de la envoltura consenso artificiales contienen más epítopos conservados que los encontrados en cualquier aislado natural individual e inducen respuestas de LCT de clado cruzado.

Una secuencia consenso teóricamente tiene ventajas y desventajas. Puesto que una secuencia consenso se genera basándose en aislados actuales, puede ser genéticamente más cercana a cepas víricas circulantes actuales que cualquier aislado de virus natural dado. Sin embargo, puesto que la secuenciación global en general está conducida con virus muestreados durante las infecciones crónicas en lugar de virus muestreados durante la infección aguda, desarrollar una respuesta de vacuna consenso sobre epítopos que en su mayoría han escapado puede ser una desventaja. Para minimizar esta desventaja, una estrategia útil para el diseño de vacuna sería para tener en cuenta secuencias transmisoras tempranas. Las proteínas de la envoltura están entre las proteínas del VIH más difíciles de construir artificialmente debido a que las regiones hipervariables en el gen de la envoltura del VIH-1 evolucionan por inserción y delección rápida y no por mutación puntual. La diferencia de las regiones hipervariables en longitud hace difícil generar las secuencias consenso de estas regiones. Recientemente, Gao y col. (Gao, F., E y col. 2005. "Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type 1 group m consensus envelope glycoprotein". *J. Virol.* 79:1.154-63) generaron una secuencia de la envoltura consenso del grupo M, sin embargo, las secuencias no consenso de las correspondientes regiones de una cepa recombinante CRF08 BC se usaron en estas regiones variables. Los estudios han indicado que los virus del subtipo C que codifican las glucoproteínas de la envoltura con regiones V1, V2 y V4 más cortas se transmiten en receptores con una frecuencia significativamente mayor que lo que se esperaría por casualidad. Las secuencias de la envoltura del subtipo A de infección temprana también tenían las secuencias del bucle V1 y V2 significativamente más cortas y menos sitios de glucosilación ligados a N potenciales (Chohan, B., D. y col. 2005. "Selection for Human Immunodeficiency Virus Type 1 envelope glycosylation variants with shorter V1-V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels". *J. Virol.* 79:6.528-6.531). Por el contrario, variantes del subtipo B recientemente transmitidas no tenían bucles V1 y V2 más cortos. Sin embargo, puede ser importante indicar que los casos de infección por subtipo B eran principalmente el resultado de la transmisión homosexual o el uso de inyección de droga. Además, los estudios han sugerido que una posible consecuencia funcional de tener una región V1, V2 compacta es incrementar la exposición del dominio de unión de CD4 y, a continuación, aumentar la susceptibilidad a

la neutralización (Edwards, T.G., y col. 2001. "Relationships between CD4 independence, neutralization sensitivity, and exposure of a CD4-induced epitope in a Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope protein". *J. Virol.* 75:5.230-5.239; Kolchinsky, P., y col. 2001. "Increased neutralization sensitivity of CD4-independent Human Immunodeficiency Virus variants". *J. Virol.* 75:2.041-2.050; Pickora, C., y col. 2005. "Identification of two N-linked glycosylation sites within the core of the Simian Immunodeficiency virus glycoprotein whose removal enhances sensitivity to soluble CD4". *J. Virol.* 79:12.575-12.583; Puffer, B.A., y col. 2002. "CD4 independent of Simian Immunodeficiency Virus Envs is associated with macrophage tropism, neutralization sensitivity, and attenuated pathogenicity". *J. Virol.* 76:2.595-2.605). Acortamos las regiones V1 y V2 cuando generamos la secuencia consenso del subtipo B.

La fase temprana de la infección por VIH-1 está dominada por virus no inductores de sincitio (NIS), los cuales se replican lentamente y usan CCR5 como su principal correceptor. Los virus inductores de sincitio (IS), los cuales surgen en aproximadamente el 50 % de los individuos infectados precedieron un declive de la célula CD4 acelerado y el trascurso clínico progresivo de la infección, usan CXCR4 como principal correceptor. Se ha demostrado un uso de correceptor diferencial de las variantes de VIH para todos los subtipos. Se ha publicado frecuentemente que los virus subtipo C parecen ser diferentes de la mayoría de otros subtipos debido a una no desrepresentación de CXCR4 usando variantes de VIH en el subtipo C. Por lo tanto, la utilización de CCR5 debería ser una consideración muy crucial para un diseño de vacuna. Informes previos mostraron que la región V3 de gp120 juega un importante papel en la utilización de correceptor. Se han identificado que seis restos en el bucle V3 son críticos para la interacción de CCR5: arginina307, lisina314, isoleucina316, arginina322, fenilalanina324 y alanina337. Sin embargo, basándose en las secuencias de transmisores tempranos del subtipo C, el resto en la posición 322 debería ser glutamina en lugar de arginina. En resumen, basándose en los estudios previos que muestran restos importantes para la utilización de CCR5 y las secuencias de transmisores tempranos, diseñamos el inmunógeno de la envoltura consenso del subtipo B que podría conducir a respuestas inmunes que pueden en teoría dirigir la utilización del correceptor CCR5.

Para maximizar la reactividad cruzada potencial, se ha creado una secuencia de la envoltura consenso del VIH-1 grupo M. Sin embargo, es posible que las vacunas consenso de envoltura específicas a subtipo puedan representar un compromiso para la similitud de secuencia general del antígeno vacuna en relación con los virus circulantes al menos al nivel de respuestas inmunes celulares. Los estudios han mostrado que había altas tasas de selección identificadas en regiones diferentes de las proteínas de la envoltura del subtipo B y C. Esto se puede causar por diferente presión inmune en diferentes regiones de la proteína de la envoltura en el subtipo B y C. Por lo tanto, puede haber ventajas en el uso de una vacuna de envoltura específica a subtipo, ya que las respuestas inmunes a la vacuna y el virus circulante compartirían dominios antigénicos. Más experimentos que comparan vacunas de envoltura específicas a grupo M y subtipo son necesarios para aclarar más este asunto.

Otra preocupación importante sobre el uso de una secuencia consenso es que su secuencia pueda asociarse a polimorfismos en combinaciones no encontradas en ningún tipo natural, así dando como resultado potencialmente conformaciones de proteína inapropiadas. Estudios previos han indicado que un inmunógeno consenso del grupo M podría plegarse dentro de la conformación nativa, conservar los epítomos antigénicos de la envoltura y provocar respuesta de anticuerpo neutralizante débil. Basándose en los hechos de que la proteína sintética podría unirse a anticuerpos 2G12, ID6 y F105, pensamos que el pEY2E1-B puede tener de alguna manera conformaciones estructurales nativas. Importantly, nuestros datos también demostraron que el inmunógeno EY2E1-B podría inducir un anticuerpo específico a la envoltura del subtipo B de mayor titulación, indicando que este inmunógeno sintético puede conservar también más epítomos clase II. Más estudios en esta área serán importantes.

Con la generación de nuevas estrategias de vacuna del VIH-1, también hay una creciente demanda para predecir la eficacia de estas vacunas en seres humanos usando modelos preclínicos. En nuestro estudio, se usaron ratones transgénicos HLA-A2 para estudiar las respuestas inmunes celulares provocadas por el inmunógeno sintético. Los estudios han mostrado que esta cepa transgénica es un modelo preclínico importante para el diseño y ensayo de vacunas para enfermedades infecciosas implicando la estimulación óptima de linfocitos T citolíticos CD8+ humanos. En este modelo los resultados indicaron que EY2E1-B podía provocar respuestas inmunes celulares mucho más amplias y más fuertes en comparación con EK2P-B, sugiriendo que esta nueva vacuna puede tener más potencial para inducir respuestas celulares restringidas a HLA-A2. Se está planeando estudio adicional de este inmunógeno en primates no humanos.

Tomándolos juntos, nuestros resultados sugieren que EY2E1-B podría servir como un inmunógeno que incrementa tanto la magnitud como la amplitud de las respuestas de LCT como un casete de vacuna de ADN. En términos más generales, esta construcción puede ser útil en otras plataformas para la inducción de respuestas inmunes celulares más fuertes y más amplias frente a cepas de VIH en planteamientos de no vector de ADN.

Ejemplo2. Desarrollo de una nueva vacuna de ADN de la envoltura del VIH-1 clado C modificada por ingeniería que aumenta la diversidad y la amplitud de la respuesta inmune celular provocada

Las respuestas de LCT específico al VIH-1 fuertes tienen un importante papel en el manejo de la carga vírica durante la infección grave y asintomática. Sin embargo, recientes estudios sobre los inmunógenos consenso no han

sido capaces de demostrar notablemente respuestas inmunes celulares mejoradas. En el presente documento ensayamos un nuevo inmunógeno de la envoltura basado en consenso del clado C modificado por ingeniería para respuesta inmune celular mejorada. La nueva vacuna (pEY3E1-C) se creó a partir de la secuencia de la envoltura consenso del VIH-1 clado C. Se realizaron varias modificaciones incluyendo el acortamiento de las regiones V1 y V2 altamente variables basándose en la secuencia transmisora temprana, retención del bucle V3 para la utilización de CCR5, separación de la región cola citoplasmática del terminal C para prevenir el reciclado de la envoltura, y retención del sitio de escisión y TMD para el plegamiento apropiado. También, se añadió una secuencia líder de IgE al terminal N. Esta vacuna de ADN consenso también estaba optimizada por ARN y optimizada por codón. La respuesta inmune celular se estudió en ratones BalB/C por ELISpot y ensayos de mapeo de epítipo. Cuando se estudió como una vacuna de ADN, en comparación con pEK3P-C (derivado de un aislado primario de env del clado C), nuestra construcción (pEY3E1-C) era más eficaz en la conducción de una respuestas inmune celular. pEY3E1-C provocó una respuesta inmune celular mayor en magnitud que pEK3P-C cuando se estimuló por péptidos del clado C consenso. Además, el inmunógeno consenso provocó un incremento en la magnitud de la respuesta inmune celular cuando se estimuló por otros dos conjuntos de péptidos de aislado primario también del clado C. Además de magnitud aumentada, se soportó amplitud aumentada de la respuesta de LCT por la capacidad de pEY3E1-C de inducir al menos 15 de los 29 grupos de péptido fuertemente reactivo (que tienen más de 50 manchas/por millón de esplenocitos), mientras que pEK3P-C solamente indujo 3 de los 29 grupos y 9 de los 29 grupos con reactividad fuerte en respuesta a dos conjuntos de péptido de aislado primario, los cuales se seleccionaron por su singularidad y capacidad de servir como un control estricto para evaluar la amplitud. Además, pEY3E1-C provocó una respuesta inmune celular de clado cruzado más fuerte cuando se estimuló con péptidos del clado B. El inmunógeno consenso pEY3E1-C aumentó tanto la magnitud como la amplitud de las respuestas de LCT como un casete de vacuna de ADN, sugiriendo que el potencial para los inmunógenos consenso sirve como un antígeno componente en un examen adicional de méritos de cóctel de vacuna del VIH.

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

Además, se ha publicado de que las vacunas de ADN que expresan la glucoproteína de la envoltura del VIH-1 no son muy inmunógenas.

Hemos usado una estrategia multifase para incrementar el potencial de la respuesta de LCT provocada por la vacuna de ADN para proporcionar posiblemente protección frente a las cepas circulantes del virus.

Recientes estudios han mostrado que un inmunógeno consenso puede superar la diversidad de obstáculo creada por el virus VIH-1 de evolución rápida.

Derdeyn y col. encontraron que una región V1-V4 más corta es característica de virus subtipo C de transmisión temprana y nuestra construcción se ha diseñado para llevar este rasgo que podría ser útil en la producción de una respuesta inmune resultante de virus transmitidos tempranos.

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

Las respuestas de LCT específico al VIH-1 han mostrado que son importantes en el control de la carga vírica durante la infección aguda y asintomática y el desarrollo del SIDA, por tanto los siguientes datos se centran en las respuestas de LCT provocadas por nuestro nuevo inmunógeno.

La Figura 13 representa el diseño del inmunógeno para el desarrollo de una nueva vacuna de ADN de la envoltura del VIH-1 clado C modificada por ingeniería que aumenta la diversidad y la amplitud de las respuestas inmunes celulares provocadas.

La Figura 14 muestra relaciones filogenéticas: se incluyeron treinta y seis secuencias de la envoltura del VIH-1 subtipo C, EY3E1-C, EK3PC, dos secuencias del subtipo B, una del subtipo A y una del subtipo D (grupo extraño) en el análisis filogenético. Las secuencias de la envoltura del subtipo C que representan una amplia muestra de diversidad eran de 12 países.

La Tabla 3 muestra el promedio y el intervalo de las puntuaciones del porcentaje de similitud entre los candidatos de vacuna de envoltura potenciales y un alineamiento de las secuencias de envoltura del subtipo C.

Tabla 3

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

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

Como se muestra en los paneles A y B de la Figura 15, respuesta celular fuerte provocada por pEY3E1-C.

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

Los Paneles A-D de la Figura 17 muestran respuestas celulares de reacción cruzada fuertes provocadas por pEY3E1-C en el mismo clado.

Los Paneles A y B de la Figura 18 muestran respuestas celulares de reacción cruzada fuertes y amplias provocadas por pEY3E1-C. El panel A muestra los datos de ELISpot de IFN-γ específico a env del subtipo C (Uruguay). Cuando se estimularon con 29 grupos de péptidos de env del clado C (Uruguay): los ratones vacunados con pEY3E1-C provocaron más de 50 manchas/millón de esplenocitos de 12 grupos; los ratones vacunados con pEK3P-C provocaron más de 50 manchas/millón de esplenocitos de 3 grupos. El Panel B muestra los datos del ELISpot de IFN-γ específico a env del subtipo C (S. África). Cuando se estimularon con 29 grupos de péptidos de env del clado C (S. África): los ratones vacunados con pEY3E1-C provocaron más de 50 manchas/millón de esplenocitos de 13 grupos; los ratones vacunados con pEK3P-C provocaron más de 50 manchas/millón de esplenocitos de 5 grupos.

Los paneles A-f de la Figura 19 muestran respuestas celulares de reacción cruzada fuertes provocadas por pEY3E1-C entre clados.

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

Ejemplo comparativo 3:

Eficacia de una nueva vacuna de ADN del VPH-16 modificada por ingeniería que codifica una proteína de fusión E6/E7

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

Las secuencias codificantes que codifican la poliproteína se insertaron en el vector pVAX para producir el plásmido p1667. La Figura 24 muestra los mapas de pVax y p1667.

Las células tumorales TC1 se inmortalizaron con E7 del VPH-16 y se transformaron con el oncogen c-Ha-ras. Estas células expresan bajos niveles de E7 y son muy tumorigénicas.

En el estudio de inmunogenicidad en ratones, a 3 ratones/por grupo de ratones C57BL6 se administraron 100 µg de ADN/por ratón. Los grupos incluían 1) control a los que se administraron con pVAX-vector control y 2) ensayo a los que se administraron con p1667. Los ratones se vacunaron los días 0, 14 y 28. El día 35, se sacrificaron los ratones y se realizó ELISPOT (Centrado en IMC).

Los datos para las respuestas inmunes celulares inducidas por el inmunógeno de ADN p1667 se muestran en la Figura 25. Los péptidos de E6 y E7 consenso del VPH 16 (37, 15-meros solapados por 9 aminoácidos) se usaron en dos grupos- grupo 1: 18 péptidos; grupo 2: 19 péptidos. Los paneles A y C muestran los datos de los esplenocitos totales. Los paneles B y D muestran los datos de las muestras con agotamiento de CD8.

La figura 26 muestra los resultados del mapeo de epítipo inmunodominante. Se indican dos secuencias.

En los experimentos profilácticos en ratones, a 5 ratones/por grupo de ratones C57BL6 se administraron 100 µg de ADN/ratón. Los grupos incluían 1) no tratados (inyectado con PBS), 2) control a los que se administraron con pVAX-vector control y 3) ensayo a los que se administraron con p1667. Los ratones se vacunaron los días 0, 14 y 28. El día 35, los ratones se expusieron a células TC-1 y después se realizaron las mediciones del tamaño del tumor. Los resultados se muestran en la Figura 27. También se muestran los datos de un grupo en el que se administró conjuntamente la construcción IL-15.

En los experimentos de regresión tumoral en ratones, a 5 ratones/por grupo de ratones C57BL6 se administraron 100 µg de ADN/ratón. Los grupos incluían 1) no tratados (inyectados con PBS), 2) control a los que se administraron con pVAX-vector control y 3) ensayo a los que se administraron con p1667. Los ratones se expusieron a 5x10⁴ células TC-1 el día 0. A los ratones se administraron la vacuna de ADN los días 3, 10 y 17. Los tumores se midieron empezando el día 8. Los resultados se muestran en la Figura 28. También se muestran los datos de un grupo en el que se administró conjuntamente la construcción IL-15.

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

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

Se emprendió un estudio de protección de la vacuna de ADN de E6/E7 en ratones transgénicos. Se realizó una comparación entre no tratados, pVAX, p1667, p1667+IL-15 y E7/HisB. Los datos se muestran en la Figura 31. p1667 y p1667+IL-15 protegió completamente.

Los datos presentados en el presente documento soportan las siguientes conclusiones. La construcción p1667 induce una fuerte respuesta inmune celular capaz de inducir linfocitos CD8+ específicos a E7 que median las respuestas de IFN-g elevadas. Hemos identificado tanto nuevos epítomos de VPH-16 subdominantes como dominantes frente a los que se generan LCT específico a antígeno después de la administración de la construcción de ADN. La construcción p1667 es capaz de prevenir el crecimiento tumoral y causar la regresión de los tumores en tanto ratones C57/BL6 como transgénicos. La vacuna de ADN p1667 muestra gran potencial para una nueva estrategia terapéutica para dirigir el cáncer asociado a VPH microscópico.

Ejemplo 4

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las secuencias consenso de env del VIH se pueden administrar como vacunas de ADN en combinación con secuencias de ácidos nucleicos que codifican otras varias proteínas del VIH tales como Gag, Pol, Gag/Pol, Nef, Vif, y Vpr usando, por ejemplo, tecnología de electroporación para la administración intramuscular o intradérmica. Las construcciones de vacuna del VIH multivalente/polivalente pueden proporcionar respuestas inmunes aumentadas y ser particularmente útiles. En algunas realizaciones, se proporcionan además las secuencias codificantes de IL-12. La publicación de la solicitud de patente americana número 20070106062, describe una vacuna de ADN de Vif del VIH. La publicación de la solicitud de patente americana número 20040106100, describe vacunas del VIH que comprenden proteínas accesorias del VIH así como las secuencias de tales proteínas que se pueden usar para preparar construcciones de vacuna adicionales. Las patentes americanas N.º 6.468.982, 5.817.637, y 5.593.972 describen las vacunas de ADN incluyendo construcciones de gag del HIV, pol del HIV y gag/pol del HIV. La electroporación se describe en la patente americana N.º 7.245.963. La solicitud PCT PCT/US97/19502, describe las construcciones de IL-12. La publicación de la solicitud americana N.º 20070041941 describe construcciones que codifican IL-15

Ejemplo 15

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

Las respuestas celulares se determinaron por ELISpot de IFNγ después de cada inmunización y cinco meses después para respuestas memoria. Por todo el estudio se evaluaron las respuestas humorales por ELISA de p24 y gp160 recombinante. La capacidad proliferativa de los linfocitos T específicos a antígeno se determinaron por tinción por CFSE. La tinción de citoquina intracelular se hizo para caracterizar más las características funcionales de la respuesta de linfocito T inducida.

El plásmido de IL-12 aumentó las respuestas celulares a nuestras construcciones optimizadas. Sin embargo, el uso de electroporación para aumentar la administración de los plásmidos era capaz de mejorar tanto la respuesta celular como humoral en comparación con la inmunización IM con plásmido de IL-12. La combinación del plásmido de IL-12 y la electroporación dio como resultado las mejores respuestas inmunes, tanto primarias como de memoria, medido por una diversidad de parámetros.

Se compararon las construcciones de ADN optimizadas que codificaban *gag* y *env* del VIH en macacos rhesus en presencia o ausencia de plásmido de IL-12 como un adyuvante de ADN. IL-12 podía básicamente incrementar las respuestas del linfocito T 5 veces en un formato de ELISpot cuantitativo dando como resultado básicamente mejores respuestas de linfocito T memoria. Sin embargo, el ADN administrado EP era más eficaz para generar respuestas de linfocito T y memoria que eran 2 veces mayores en comparación con la vacuna de ADN con adyuvante IM con IL-12.

Las mejores respuestas se observaron en el grupo de tratamiento de combinación de EP+adyuvante IL-12. Las respuestas memorias en este grupo de tratamiento eran 10 veces mayores que el ADN IM solo y casi 2 veces mayores que EP solo. También observamos expansión inmune 4 veces mejor por CFSE en el grupo de tratamiento EP+IL-12 en comparación con EP solo. La presencia de linfocitos T polifuncionales también sugirió que el grupo de tratamiento de ADN+citoquina+EP es más eficaz.

Materiales y métodos

Animales:

Los macacos rhesus (*Macaca mulatta*) se alojaron en BIOQUAL, Inc. (Rockville, MD), de acuerdo con los patrones de la "American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care". Los animales se dejaron aclimatar durante al menos 30 días en cuarentena antes de cualquier experimentación.

Inmunización

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

Recogida de sangre:

Se sangraron animales cada dos semanas durante la duración del estudio. Se recogieron 10 ml de sangre en tubos EDTA. Se aislaron CMSP por centrifugación Ficoll-hypaque convencional y, a continuación, se resuspendieron en medio de cultivo completo (RPMI 1640 con 2 mM/l de L-glutamina complementado con 10 % de suero fetal bovina inactivado por calor, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, y 55 µM/l de β-mercaptoetanol) los GR se sometieron a lisado con tampón de lisis ACK (Cambrex Bio Science, East Rutherford, NJ).

Plásmidos y productos de plásmido:

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

CFSE de CMSP crioconservadas

Se descongelaron rápidamente CMSP crioconservadas en un baño de agua a 37 °C y se lavaron con medios completos. Las células se incubaron durante la noche en una incubadora a 37 °C y los recuentos celulares se obtuvieron el siguiente día. Las células se precipitaron y resuspendieron en 1 ml de CFDA SE (Molecular Probes, Eugene, OR) en PBS (1:2.000 dilución). Las células se incubaron a 37 °C durante 10 min. Las células se lavaron con medios completos y se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 células/100 ul y se colocaron en placas de fondo redondo de 96 pocillos con 100 ul de 2 µg/ml de p24 o gp120 del VIH-1 recombinante (ImmunoDiagnostics, Woburn, MA) más grupos de péptido. 5 µg/ml de concavalina A (positivo) y medios completos (negativo) se usaron como controles. Los cultivos se incubaron durante 5 días. Primero las células se tiñeron con tinte violeta Vivid, un marcador de célula viva/muerta, durante 15 min sobre hielo. Las células se lavaron una vez con PBS. A continuación, las células se tiñeron usando anti-CD3-PE humano (clon SP34-2) (BD Pharmingen) y anti-CD4-PerCP humano (clon L200), anti-CD8-APC humano (SK1) durante 1 hora a 4 °C. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con 1 % de paraformaldehído. Los datos se recogieron usando un citómetro de flujo LSR II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Se analizaron los datos de la citometría de flujo usando el programa informático FlowJo (Tree Star, Ashland, OR), selección por ventana de análisis (*gating*) sobre linfocitos CD3+. Se recogieron treinta a cincuenta mil linfocitos CD3+ por muestra.

ES 2 706 501 T3

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA):

Se cubrieron noventa y seis placas durante la noche con 100 ng/pocillo de p24 o g120 del VIH-1 IIIB recombinante (ImmunoDiagnostics) para determinar las respuestas de gag y env del VIH respectivamente. Las placas cubiertas con 100 ng/pocillo de albúmina bovina de suero sirvieron como control negativo. Las placas se bloquearon con PBST con BSA al 3 % durante 1 hora a 37 °C. A continuación, las placas se incubaron con cuatro veces diluciones de suero en serie durante 1 hora a 37 °C. A continuación, se añadió anticuerpo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante anti-IgG de mono a una dilución 1:10.000 (MP Biomedicals, Aurora, OH) a las placas y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Se usó tetrametilbenzidina (R&D systems, Minneapolis, MN) para desarrollar las placas y las reacciones se pararon con H₂SO₄ 2N. A continuación, se midieron las densidades ópticas (DO).

Las titulaciones finales de IgG se definieron como la dilución de suero recíproca que dio como resultado valores de DO que eran mayores que dos veces el valor de DO promedio de los pocillos con BSA.

Ensayo de inmunomancha ligado a enzima (ELISpot)

Las respuestas específicas a antígeno se determinaron restando el número de manchas en los pocillos control negativo de los pocillos que contenían péptidos. Los resultados se muestran como el valor medio (manchas/millón de esplenocitos) obtenido por pocillos por triplicado.

1. Tinción de citoquina intracelular

Reactivos de anticuerpo

Los anticuerpos directamente conjugados se obtuvieron de lo siguiente: BD Biosciences (San José, CA): IL-2 (PE), CD3 (Pacific Blue), IFN- γ (PE-Cy7), y TNF- α (Alexa Fluor 700), CD8 (APC) y CD4 (PerCP).

Estimulación celular y tinción

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

Citometría de flujo

Las células se analizaron sobre un citómetro de flujo LSR II modificado (BD Immunocytometry Systems, San José, CA). Se recogieron cincuenta mil eventos de CD3⁺ por muestra. El análisis de datos se realizó usando FlowJo versión 8.4.1 (TreeStar San Carlos, CA). La selección por ventana de análisis (*gating*) inicial usó una gráfica de área de dispersión frontal (FSC-A) frente a altura (FSC-H) para eliminar los dobletes. Los eventos se sometieron a una ventana de análisis (*gate*) de linfocito por una gráfica FSC-A frente a SSC. Después de esto, los eventos se sometieron a selección por ventana de análisis secuencialmente sobre los eventos de CD3⁺, CD8⁺, y CD4⁻ frente a IFN- γ para tener en cuenta la regulación a la baja. Después de la identificación de los linfocitos T CD8⁺, se realizó una ventana de análisis para cada respectiva función usando combinaciones que proporcionaron separación óptima. Después de que se crearan las ventanas de análisis para cada función, usamos la plataforma de ventana de análisis Booleano para crear la matriz completa de las posibles combinaciones, igualando a 8 patrones de respuesta cuando se ensayan 3 funciones. Los datos se publicaron después de la corrección de fondo. Los umbrales para las respuestas positivas eran de 10 eventos o 0,05 %.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el programa informático Prism Graphpad, y se expresaron como medias \pm EEM.

Resultados

Análisis ELISpot

La inducción de la respuesta inmune celular se evaluó después de cada inmunización por ELISpot de IFN- γ . Después de una inmunización sencilla (Figura 1), el grupo que recibía ADN plásmido por inyección IM solo mostró respuestas celulares débiles (74 ± 29 SFU/ 10^6 CMSP). La inmunización conjunta con plásmido de IL-12 de rhesus dio como resultado una respuesta mayor ($136 \pm 51,4$ SFU/ 10^6 CMSP). El grupo sometido a electroporación (EP) tenía una respuesta promedio que era seis veces mayor que el grupo IM (482 ± 181 SFU/ 10^6 CMSP). La combinación de la

inmunización conjunta de IL-2 con EP dobló más el número de células productoras de IFN- γ (1.030 ± 494 SFU/ 10^6 CMSP).

5 Después de dos inmunizaciones (Figura 1), Los grupos IM y IM+IL-12 tenían un incremento modesto en los recuentos de ELISpot ($104 \pm 67,9$ SFU/ 10^6 CMSP y $223 \pm 76,6$ SFU/ 10^6 CMSP, respectivamente). El grupo EP tenía respuestas que eran casi cuatro veces mayores (1.924 ± 417 SFU/ 10^6 CMSP) que la inmunización previa y el grupo EP+IL-12 había de nuevo doblado el número de células productoras de IFN- γ (2.819 ± 872 SFU/ 10^6 CMSP) en comparación con el grupo de tratamiento EP solo.

10 Después de la tercera inmunización (Figura 1), el número de células específicas a antígeno en el grupo EP era más de un log mayor que el del grupo IM (5.300 ± 3.781 y 370 ± 110 SFU/ 10^6 CMSP, respectivamente). El grupo IM+IL-12 también tenía un incremento drástico en las respuestas celulares con recuentos de ELISpot que eran casi un log mayor que la inmunización previa (2.042 ± 311 SFU/ 10^6 CMSP). Como con las otras dos inmunizaciones, el grupo EP+IL-12 era el más potente de todos los grupos de vacunación (7.228 ± 2.227 SFU/ 10^6 CMSP).

15 *Inducción de las respuestas de la envoltura de reacción cruzada*

Una vacuna del VIH con éxito requerirá la inducción de una respuesta inmune de reacción cruzada a este respecto era interesante ver si EP+IL-12 podría mejorar la magnitud de la reactividad cruzada a genotecas peptídicas divergentes. Comparamos las respuestas de LCT de reacción cruzada inducida por el antígeno *env* usando una genoteca peptídica de un grupo consenso M. Se observó la reactividad cruzada en todos los grupos. Sin embargo, los resultados mostraron las mismas diferencias de magnitud observadas en el análisis ELISpot del subtipo B (Figura 2). Después de 3 inmunizaciones, el grupo IM tenía la respuesta más baja a los péptidos de la envoltura del grupo M ($222 \pm \text{EEM}$ SFU/ 10^6 CMSP). La adición de IL-12 dobló la respuesta ($540 \pm \text{EEM}$ SFU/ 10^6 CMSP). Se indujeron mayores respuestas de la envoltura del grupo M con EP ($830 \pm \text{EEM}$ SFU/ 10^6 CMSP), las cuales se aumentaron más con la inyección conjunta de IL-12 ($1.238 \pm \text{EEM}$ SFU/ 10^6 CMSP).

1. Respuestas de linfocito T memoria

30 Un asunto importante es ser capaz de mejorar la generación de las respuestas memoria con la plataforma de ADN. Realizamos el análisis ELISpot cinco meses después de la última vacunación de ADN (Figura 3). En los grupos IM, la adición del plásmido de IL-12 dio como resultado casi un incremento de 10 veces en las células memoria ($751 \pm 11,1$ y $78,6 \pm 16,9$ SFU/ 10^6 CMSP). Está claro que IL-12 puede impactar positivamente en este fenotipo de linfocito T importante. El número de células productoras de IFN γ específicas a antígeno era sustancial en el grupo EP también, sin embargo, el adyuvante IL-12+EP dio como resultado la respuesta memoria más fuerte ($1.231 \pm 523,5$ y 3.795 ± 1.336 SFU/ 10^6 CMSP respectivamente), una respuesta que muestra que la tecnología combinada conduce a respuestas memoria de linfocito T muy fuertes.

40 *Respuestas inmunes humorales a vacunas de ADN*

La debilidad de la tecnología de vacuna de ADN IM reside en su incapacidad de inducir respuestas de anticuerpo claras en primates no humanos y en estudios clínicos humanos. Evaluamos la capacidad de cada grupo para inducir titulaciones de anticuerpo específico a tanto gag como *env* del VIH-1 a antígenos p24 y gp160 recombinantes en un formato ELISA. Para ambos antígenos, los grupos IM e IM+IL-12 no mostraron titulaciones de anticuerpo significativas ($<1:50$ titulación final). Los grupos sometidos a electroporación presentaron titulaciones de anticuerpo gag drásticamente mayores que eran capaces de unirse a p24 recombinante. Aunque tanto los grupos EP como los EP+IL-12 tenían titulaciones finales similares en la semana 12 (22.400 y 12.800 respectivamente), el grupo EP+IL-12 generó una respuesta de anticuerpo más eficaz. Esa respuesta apareció antes en el esquema de inmunización y surgió al máximo nivel lo más rápido. Las respuestas de anticuerpo *env* también reflejaron los resultados que observamos con el antígeno gag, aunque con titulaciones finales menores.

Proliferación de linfocito T CD4+ y CD8+

55 Habiendo observado las respuestas de ELISpot sustanciales, a continuación, examinamos los parámetros adicionales de la inmunidad celular. Examinamos la capacidad de los linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos a gag de proliferar *in vitro* después de la estimulación peptídica entre los diferentes grupos de tratamiento de inmunización. Las muestras crioconservadas, recogidas dos semanas después de la inmunización final, se estimularon y analizaron por ensayo con CFSE. La respuesta de CD4+ promedio se incrementó igual a lo observado en el ensayo ELISpot. En comparación, la inducción de proliferación de CD8 era mucho más drástica en magnitud. Observamos que la proliferación de linfocito T CD8+ incrementada por IL-12 sobre IM solo y EP era básicamente mayor. El grupo EP+IL-12 tenía el mayor porcentaje de células CD8+ que eran capaces de proliferar después de la estimulación *in vitro* ($2,51 \pm \text{EEM}$ % y $4,88 \pm \text{EEM}$ %, respectivamente). Se observaron bandas de proliferación de linfocito T CD8 obvias en el grupo de tratamiento EP+IL-12, demostrando el potencial proliferativo potente de esta inmunización combinada.

65

Respuestas del linfocito T CD8+ polifuncional

Aunque claramente hemos observado la inducción de una respuesta efectora de IFN γ fuerte después de inmunización conjunta EP y IL-12, queríamos caracterizar además las funciones de las respuestas de linfocito T CD8+ específicas a antígeno en los diversos grupos de tratamiento. Las muestras tomadas tres meses después de la inmunización final se estimularon con péptidos de gag y se tiñeron para la producción de citoquina celular de IFN γ , TNF α y IL-2. De todos los grupos, solamente un animal en el IM+IL-12 y un animal en el grupo de solamente EP tenían una respuesta de IFN γ detectable. Sin embargo, dos de los tres animales en el grupo inmunizado EP+IL-12 tenían linfocitos T CD8+ productores de IFN γ específico a gag. El respondedor de IM+IL-12 tenía un pequeño porcentaje de células polifuncionales que se teñían para todas las tres citoquinas así como una población que había perdido su capacidad de producir IL-2. El respondedor de EP tenía respuestas polifuncionales ligeramente mayores que estaban comprendidas de cuatro poblaciones diferentes. La respuesta más drástica se veía en el segundo animal de EP+IL-12. Más del 2 % de sus linfocitos T CD8+ eran capaces de producir todas las tres citoquinas y el 2 % eran capaces de producir tanto IFN γ como TNF α . Claramente el número de animales en cada grupo es bajo y requiere de estudios de primates adicionales para confirmar estos resultados, sin embargo, colectivamente las tendencias observadas parecen claras y alentadoras.

Conclusión

IL-12 como un adyuvante de la vacuna de ADN mejoró las respuestas de ELISpot varias veces sobre el plásmido solo. Además se aumentó claramente la proliferación. El grupo EP presentó una respuesta promedio mayor que o bien el grupo IM solo o el grupo de tratamiento IM+IL-12 que presentaba una respuesta de ELISpot combinada que era 3x mayor que el grupo IM+IL-12. Las mejores respuestas de ELISpot se observaron en el grupo de tratamiento EP+IL-12, las cuales eran casi 4x sobre el grupo de tratamiento IM+IL-12 19x IM solo.

Después de cada inmunización se determinó la magnitud de la respuesta específica a antígeno por ELISpot de IFN γ . Después de una inmunización única todos los animales en los grupos EP y EP+IL-12 no solamente tenían respuestas detectables, tenían promedios que eran mayores que los vistos en el grupo IM después de tres inmunizaciones. Después de dos inmunizaciones, las respuestas de IFN γ en los grupos EP y EP+IL-12 eran comparables a las respuestas que se han publicado en estudios que usaban vectores víricos. Respuestas memoria sustanciales se observaron en los grupos IM+IL-12 y ambos EP cinco meses después de la última inmunización.

La inmunización IM, con o sin IL-12, no dio como resultado una cantidad significativa de anticuerpo. La electroporación era capaz de aumentar la respuesta inmune humoral como se informó previamente. Todos los animales en los grupos sometidos a electroporación se seroconvirtieron. Aunque los grupos EP y EP+IL-12 tenían titulaciones finales similares después de tres inmunizaciones la cinética de la inducción de anticuerpo era ligeramente más rápida en el grupo EP+IL-12.

La capacidad proliferativa de los linfocitos T CD8 pareció ser aumentada con EP y plásmido de IL-12. Estos datos soportan la expansión de memoria observada en el ensayo ELISpot donde la expansión del linfocito T específico a antígeno es probablemente un resultado del potencial proliferativo aumentado del grupo de tratamiento EP+IL-12.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 45 <110> The Trustees of the University of Pennsylvania
- <120> VACUNAS MEJORADAS Y MÉTODOS PARA USAR LAS MISMAS
- <130> P46844EP3/TCL
- 50 <150> EP13187666.6
- <151> 30-07-2007
- <150> US60/833.861
- 55 <151> 28-07-2006
- <150> US60/833.856
- <151> 28-07-2006
- 60 <150> US60/890.352
- <151> 16-02-2007
- <160> 43
- 65 <170> PatentIn versión 3.4

ES 2 706 501 T3

<210> 1
 <211> 2142
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción de secuencia de ADN de la envoltura consenso del subtipo A

<400> 1

10

```

ggatccatgg actggacctg gattctgttc ctggtggccg ccgccaccag agtgcacagc      60
agagtgatgg gcatccagcg gaattgccag cacctgtgga gatggggcac catgatcctg      120
ggcatgatca tcatctgctc tgccgccgag aacctgtggg tgaccgtgta ctacggcgtg      180
cctgtgtgga aggacgccga gaccaccctg ttctgcgccca gcgacgccaa ggcctacgat      240
accgaagtgc acaatgtgtg ggccaccac gctgtcgtgc ctaccgatcc caacccccag      300
gagatcaacc tggagaacgt gaccgaggag ttcaacatgt ggaagaacaa catggtggag      360
cagatgcaca ccgacatcat cagcctgtgg gaccagagcc tgaagccttg cgtgaagctg      420
accctctgtg gcgtgacctt gaactgcagc aacgtgaacg tgaccaccaa catcatgaag      480
ggcgagatca agaactgcag cttcaacatg accaccgagc tgcgggacaa gaagcagaaa      540
gtgtacagcc tgttctacaa gctggacgtg gtgcagatca acaagagcaa cagcagcagc      600
cagtaccggc tgatcaactg caacaccagc gccatcacc ccaggcctgcc caaagtgagc      660
ttogagccca tccccatcca ctactgcgcc cctgccggct tcgccatcct gaagtgcaag      720
gacaaggagt ttaacggcac cggcccctgc aagaatgtga gcaccgtgca gtgcaccac      780
ggcatcaagc ccgtggtgtc caccagctg ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggaa      840
gtgatgatcc ggagcgagaa catcaccaac aacgccaaga acatcatcgt gcagctgacc      900
    
```

ES 2 706 501 T3

aagcccgtga agatcaattg caccoggccc aacaacaaca cccggaagag catcagaatc 960
ggccctggcc aggccttcta cgccacgggc gacatcatcg gcgatatcag gcaggcccac 1020
tgcaatgtga gccggaccga gtggaacgag accctgcaga aagtggccaa gcagctgogg 1080
aagtacttca acaacaagac catcatcttc accaacagca gggcgggcag actgagaatc 1140
accaccaca gcttcaattg tggcggcgag ttcttctact gcaatacctc cggcctgttc 1200
aacagcaact ggaacggcaa cggcaccaag aagaagaaca gcaccgagag caacgacacc 1260
atcaccctgc cctgccggat caagcagatc atcaatatgt ggcagagggt gggccaggcc 1320
atgtacgccc ctcccatcca gggcgtgatc agatgcgaga gcaacatcac cggcctgctg 1380
ctgaccagag atggcggcga caacaacagc aagaacgaga ccttcagacc tggcggcgga 1440
gacatgaggg acaactggcg gagcagctg tacaagtaca aagtggtgaa gatcgagccc 1500
ctgggctggg cccccaccaa ggccaagaga agagtgggtg agcgggagaa gagagctgtg 1560
ggcatcgggc cctgttctct gggcttctct ggagccgccc gaagcaccat gggagccgcc 1620
agcatcacc tgaccgtgca ggccagacag ctgctgagcg gcattgtgca gcagcagagc 1680
aacctgctga gagccatcga ggcccagcag cacctgctga agctgacagt gtggggcacc 1740
aacagctgc aggcccgcgt gctggccgtg gagagatacc tgaaggacca gcagctgctg 1800
ggcatctggg gctgcagcgg caagctgato tgcaccacca acgtgccctg gaatagcagc 1860
tggagcaaca agagccagag cgagatctgg gacaacatga cctggctgca gtgggacaag 1920
gagatcagca actacaccga tatcatctac aacctgatcg aggagagcca gaaccagcag 1980
gagaagaacg agcaggatct gctggccctg gacaagtggg ccaacctgtg gaactggttc 2040
gacatcagca actggctgtg gtacatcaag atcttcatca tgattgtggg cggcctgatc 2100
ggcctgagaa tcgtgttcgc cgtgctgtct gtgtgactcg ag 2142

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

5

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

10

<400> 2

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

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

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

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Val Leu Ser Val
 705

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

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

<400> 3

ggatccgccca ccatggactg gacctggatt ctgttctctgg tggccgccgc caccagagtg 60
 cacagcagag tgaagggcat ccggaagaac taccagcacc tgtggagatg gggcaccatg 120
 ctgctgggca tgctgatgat ctgtttctgcc gccgagaagc tgtgggtgac cgtgtactac 180
 ggcgtgcctg tgtggaagga ggccaccacc accctgttct gcgccagcga cgccaaggcc 240
 tacgataccg aagtgcacaa tgtgtgggcc acccacgcct gcgtgcctac cgatcccaac 300

ES 2 706 501 T3

cctcaggaag tgggtgctgga gaacgtgacc gagaacttca acatgtggaa gaacaacatg 360
 gtggagcaga tgcacgagga catcatcagc ctgtgggacc agagcctgaa gccttgcggtg 420
 aagctgaccc ctctgtgctg gaccctgaac tgcaccgacc tgagcggcga gaagatggag 480
 aagggcgaga tcaagaactg cagcttcaac atcaccacct ccatccggga caaagtgcag 540
 aaggagtacg ccctgttcta caagctggac gtggtgcca tcgacaacga caaccaccgac 600
 taccggctga tcagctgcaa caccagcgtg atcaccagg cctgccccaa agtgagcttc 660
 gagcccatcc ccatccacta ctgogccctt gccggcttcg ccatcctgaa gtgcaacgac 720
 aagaagttca acggcaccgg cccttgacc aatgtgagca ccgtgcagtg caccacggc 780
 atcagacccg tgggtgtccac ccagctgctg ctgaacggca gcctggccga ggaagaagtg 840
 gtgatccgga gcgagaattt caccaacaac gccaaacca tcatcgtgca gctgaacgag 900
 agcgtggaga tcaactgcac ccggcccaac aacaataccc ggaagagcat ccacatcggc 960
 cctggccagg cttctacac caccggcgag atcatcggcg atatcaggca ggcccactgc 1020
 aatatcagcc gggccaagtg gaacaacacc ctgaagcaga tcgtgaagaa gctgcgggag 1080
 cagttcggca acaagaccat cgtgttcaac cagagcagcg gggcgagacc tagaatcgtg 1140
 atgcacagct tcaactgtgg cggcgagttc ttctactgca acacaacca gctgttcaac 1200
 agcacctgga acgtgaacgg gacctggaac aacaacaccg agggcaacga caccatcacc 1260
 ctgccctgcc ggatcaagca gatcatcaat atgtggcagg aggtgggcaa ggccatgtac 1320
 gcccctcca tcagaggcca gatccggtgc agcagcaata tcaccggcct gctgctgacc 1380
 agagatggcg gcaacaataa caccaacgag accgagatct ttagacctgg cggcggagac 1440
 atgagggaca actggcggag cgagctgtac aagtacaaag tggatgaagat cgagcccctg 1500
 ggcgtggccc ccaccaaggc caagagaaga gtggtgcagc gggagaagag agctgtgggc 1560
 atcggcgcca tgtttctggg ctttctggga gccgccgaa gcaccatggg agccgccagc 1620
 atgaccctga ccgtgcaggc cagacagctg ctgagcggca tcgtgcagca gcagaacaac 1680
 ctgctgagag ccatcgaggc ccagcagcac ctgctgcagc tgacagtgtg gggcatcaag 1740
 cagctgcagg ccccgctgct ggccgtggag agatacctga aggaccagca gctgctggga 1800
 atctggggct gcagcggcaa gctgatctgc accaccaccg tgccctggaa cgccagctgg 1860
 agcaacaaga gcctggacga gatctgggac aacatgacct ggatggagtg ggagcgggag 1920
 atcgacaact acaccagcct gatctacacc ctgatcgagg agagccagaa ccagcaggag 1980
 aagaacgagc aggagctgct ggagctggac aagtgggcca gcctgtggaa ctggttcgac 2040
 atcaccaact ggctgtggta catcaagatc ttcatcatga ttgtgggagg cctgatcggc 2100
 ctgagaatcg tgttcgccgt gctgagcatc taccctacg acgtgcccga ttacgcctga 2160
 gaattcgtaa gtaagtgtca tatgggagag ctcgactaga ctggacagcc aatgacgggt 2220

ES 2 706 501 T3

```

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

```

<210> 4
 <211> 715
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción de secuencia de la proteína de la envoltura consenso del subtipo B

<400> 4

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 706 501 T3

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

ES 2 706 501 T3

Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn
 385 390 395 400

Val Asn Gly Thr Trp Asn Asn Asn Thr Glu Gly Asn Asp Thr Ile Thr
 405 410 415

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

Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser
 435 440 445

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Asp Glu Ile
 610 615 620

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

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

<220>
10 <223> Construcción de secuencia de ADN de la envoltura consenso del subtipo C

<400> 5

```

ggatccgccca ccatggattg gacctggatt ctgttcctgg tggccgccgc cacaagagtg      60
cacagcagag tgcggggcat cctgagaaat tgccagcagt ggtggatctg gggcattctg      120
gggttctgga tgcctgatgat ctgcaacgtg atgggcaacc tgtgggtgac cgtgtactac      180
ggcgtgcctg tgtggaagga ggccaagacc accctgttct gtgccagcga tgccaaggcc      240
tacgagaccg aggtgcacaa tgtgtgggcc acccacgcct gtgtgcccac cgatcccaac      300
cctcaggaga tgggtgctgga gaacgtgacc gagaacttca acatgtggaa gaacgacatg      360
gtggaccaga tgcacgagga catcatcagc ctgtgggacc agagcctgaa gccttgctgtg      420
aagctgaccc ctctgtgcgt gacctgaac tgccggaaca acgtgaacaa caacaacacc      480
atgaaggagg agatcaagaa ctgcagcttc aacatcacca ccgagctgcg ggacaagaag      540
cagaaggtgt acgccctggt ctaccggctg gacatcgtgc ccctgaacga gaagaacaac      600
agcaacgact accggctgat caactgcaac accagcgcca tcaccaggc ctgtcccaag      660
gtgtccttgc accccatccc catccactat tgtgcccctg ccggctacgc catcctgaag      720
tgcaacaaca agaccttcaa cggcaccggc ccctgcaata atgtgagcac cgtgcagtgt      780
accacggca tcaagcctgt ggtgtccacc cagctgctgc tgaatggcag cctggccgag      840
gaggagatta tcatccggag cgagaacctg accaacaacg ccaagaccat cattgtgcac      900
ctgaatgaga gcgtggagat cgtgtgtacc cggcccaaca acaatacccg gaagagcatc      960
agaatcggcc ctggccagac cttttaogcc accggcgaca tcatcggcga tatcaggcag     1020
    
```

ES 2 706 501 T3

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

5 <210> 6
 <211> 705
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción de secuencia de la proteína de la envoltura consenso del subtipo C

<400> 6

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

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

ES 2 706 501 T3

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

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile
705

<210> 7
<211> 2089
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Construcción de secuencia de ADN de la envoltura consenso del subtipo Dt

<400> 7

gggcatcaag cggaattacc agcacctgtg gaagtggggc accatgctgc tgggcatgct 60
gatgacctgc agcgtggccg agaacctgtg ggtgaccgtg tactacggcg tgcctgtgtg 120
gaaggaagcc accaccacc tgttctgocg cagcgatgcc aagagctaca agaccgaggc 180
ccacaatatic tgggccacc acgcctgcgt gcctaccgat cccaaccctc aggagatcga 240
gctggagaac gtgaccgaga acttcaacat gtggaagaac aacatggtgg agcagatgca 300
cgaggacatc atcagcctgt gggaccagag cctgaagcct tgcgtgaagc tgaccctct 360
gtgcgtgacc ctgaactgca cgcacggcat gaggaacgac accaacgata ccaacgtgac 420

ES 2 706 501 T3

catggaggag ggcgagatga agaactgcag cttcaacatc accaccgaag tgcgggacaa 480
 gaagaagcag gtgcacgccc tgttctacaa gctggacgtg gtgcccacgc acgacaacaa 540
 caccaacaac agcaactacc ggctgatcaa ctgcaacacc agcgccatca cccaggcctg 600
 ccccaaagtg accttcgagc ccatccccat ccactactgc gccctgccc gcttcgccat 660
 cctgaagtgc aaggataaga agttcaacgg caccggcccc tgcaagaatg tgagcacctg 720
 gcagtgcacc cacggcatca gacccgtggt gtccaccag ctgctgctga acggcagcct 780
 ggccgaggag gagatcatca tcoggagcga gaacctgacc aacaacgcc aagatcatcat 840
 tgtgcagctg aacgagagcg tgaccatcaa ttgcaccgg ccctacaaca ataccggaa 900
 gcgcatcccc atcggcctgg gccaggcctt ctacaccacc agaggcatca tcggcgacat 960
 cagacaggcc cactgcaata tcagcggagc cgagtggaat aagaccctgc agcaggtggc 1020
 caagaagctg ggcgacctgc tgaacaagac caccatcatc ttcaagccta gcagcggcgg 1080
 cagacctaga atcaccacc acagcttcaa ttgtggcggc gatttcttct actgcaatac 1140
 cagccggctg ttcaacagca cctggagcaa gaacagcacc agcaactcca ccaaggagaa 1200
 caacaccatc accctgcctt gccggatcaa gcagatcatc aatatgtggc agggagtggg 1260
 caaggccatg tacgcccctc ccacgaggg cctgatcaag tgcagcagca acatcaccgg 1320
 cctgctgctg accagagatg gcggagccaa caactcccac aacgagacct tcagacctgg 1380
 cggcggagac atgagggaca actggcggag cgagctgtac aagtacaaag tggatgaagat 1440
 cgagcccctg ggcgtggccc ccaccagagc caagagaaga gtggaggagc gggagaagag 1500
 agccatcgga ctgggcgcca tgttcctggg cttcctggga gccgcccggaa gcaccatggg 1560
 agccgccagc ctgacctga ccgtgcaggc cagacagctg ctgagcggca tcgtgcagca 1620
 gcagaacaac ctgctgagag ccattgaggc ccagcagcac ctgctgcagc tgacagtgtg 1680
 gggcattaag cagctgcagg ccaggattct ggccgtggag cgctacctga aggatcagca 1740
 gctgctggga atctggggct gcagcggcaa gcacatctgc accaccaccg tgccttgaa 1800
 tagcagctgg agcaacaaga gcctggacga gatctggaac aacatgacct ggatggagtg 1860
 ggagagggag atcgacaact acaccggcct gatctacagc ctgatcgagg agagccagac 1920
 ccagcaggag aagaacgagc aggagctgct ggagctggac aagtgggcca gcctgtggaa 1980
 ctggttcagc atcaccagc ggctgtggta catcaagatc ttcatcatga ttgtggcgg 2040
 cctgatcggc ctgagaatcg tgttcgccgt gctgagcctg tgactcgag 2089

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

 <220>

5

ES 2 706 501 T3

<223> Construcción de secuencia de la proteína de la envoltura consenso del subtipo D

<400> 8

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

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

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

ES 2 706 501 T3

<220>

<223> Construcción de secuencia de ADN de Nef-Ref consenso del subtipo B

5

<400> 9

```

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

```

<210> 10

<211> 341

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción de secuencia de la proteína Nef-Rev consenso del subtipo B

15

<400> 10

```

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

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

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

```

20

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

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

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

Ser Gly Thr Lys Glu
 340

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

<220>
 <223> Construcción de secuencia de ADN consenso de Gag del subtipo A, B, C y D

<400> 11

ggatccgccca ccatggactg gacctggatt ctgtttctgg tcgccgccgc cacaagagtg 60
 cacagcggcg ccagagccag cgtgctgtcc ggcggcaagc tggacgcctg ggagaagatc 120
 agactgaggc ctggcggcaa gaagaagtac cggctgaagc accttgtgtg ggccagcaga 180
 gagctggaga gattcgccct gaatcctggc ctgctggaga ccagcgaggg ctgtaagcag 240
 atcatcggcc agctgcagcc cgccctgcag accggcagcg aggagctgag aagcctgtac 300
 aacaccgtgg ccaccctgta ctgctgcac gagaagatcg aggtgaagga caccaaggag 360
 gccctggaca agatcgagga ggagcagaac aagagcaagc agaaggccca gcaggccgcc 420
 gccgacaccg gcaacagcag ccagggtgtcc cagaactacc ccatcgtgca gaatctgcag 480
 ggccagatgg tgcaccaggc catcagcccc agaaccctga atgcctgggt gaaggtgatc 540
 gaggagaagg ccttcagccc tgaggtgatc cctatgttca gcgccctgag cgagggcgcc 600
 acacctcagg acctgaacac catgctgaac acagtggggg gccaccaggc cgccatgcag 660
 atgctgaagg ataccatcaa cgaggaggcc gccgagtggg acagactgca ccccgtgcac 720
 gccggacctc tcgcccctgg ccagatgaga gagcccagag gcagcgacat cgccggcacc 780
 acctccacce tgcaagagca gatcggctgg atgaccagca acccccccat cctgtgggpc 840
 gacatctaca agcggtgat catcctgggc ctgaacaaga ttgtgaggat gtacagcccc 900
 gtgtccatcc tggatatcag gcagggcccc aaggagccct tcagagacta cgtggaccgg 960
 ttcttcaaga ccctgagagc cgagcaggcc agccaggacg tgaagaactg gatgaccgag 1020
 accctgctgg tgcagaacgc caaccccgac tgtaagacca tcctgagagc cctgggcccc 1080
 ggcgccaccc tggaggagat gatgaccgcc tgccaggag tgggcggacc cggccacaag 1140
 gccagagtgc tggccgaggc catgagccag gccaccaaca gcaacatcat gatgcagcgg 1200

ES 2 706 501 T3

```

ggcaacttca gagggcccag gaggatcgtg aagtgcttca actgtggcaa ggagggccac 1260
atcgccagaa actgtagggc ccccaggaag aagggctgct ggaagtgtgg caaagagggg 1320
caccagatga aggactgtac cgagcggcag gccaatctcc tggggaagat ctggcccagc 1380
cacaagggca gaccocggcaa tttcctgcag agcagacctg agcccaccgc ccctcccgcc 1440
gagagcttgc gcttcggcga ggagatcacc cccagcccca agcaggagcc caaggacaga 1500
gagctgtacc ctctggccag cctgaagagc ctgttcggca acgatcccct gagccagtac 1560
ccctacgacg tgcccgatta cgcctgagaa ttcgtaagta agtgtcatat gggagagctc 1620
gactagactg gacagccaat gacgggtaag agagtgacat ttctcactaa cctaagacag 1680
gagggccgtc aaagctactg cctaatacaa tgacgggtaa tagtgacaag aatgtatca 1740
ctccaacctg agacagggcg agcctccgag ggatgtgtct tttgtttttt ataattaa 1800
agggtgacat gtccggagcc gtgctgcccg gatgatgtct tggcctctgt ttgctgcggc 1860
cgc 1863

```

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

10
<220>
<223> Construcción secuencia de la proteína consenso de Gag del subtipo A, B, C y D
<400> 12

```

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- <400> 13
- gtcgtccgc tagctgtgg gtcacagtct attatggggt acc 43

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

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

- <400> 14
- ggcggatcc ttactccacc actctccttt ttgcc 35

- 25 <210> 15
- <211> 17

ES 2 706 501 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia líder de IgE

<400> 15

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

His

10 <210> 16
 <211> 692
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

20 <400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

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

ES 2 706 501 T3

Trp Asn Gly Asn Gly Thr Lys Lys Lys Asn Ser Thr Glu Ser Asn Asp
385 390 395 400

Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln
405 410 415

Arg Val Gly Gln Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Gln Gly Val Ile Arg
420 425 430

Cys Glu Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asp
435 440 445

Asn Asn Ser Lys Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg
450 455 460

Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu
465 470 475 480

Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Glu Arg
485 490 495

Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu Gly
500 505 510

Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Ile Thr Leu Thr Val Gln
515 520 525

Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu Leu
530 535 540

Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Lys Leu Thr Val Trp Gly
545 550 555 560

Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys
565 570 575

Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys
580 585 590

Thr Thr Asn Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn Lys Ser Gln Ser
595 600 605

Glu Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Leu Gln Trp Asp Lys Glu Ile Ser
610 615 620

Asn Tyr Thr Asp Ile Ile Tyr Asn Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln
625 630 635 640

ES 2 706 501 T3

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

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

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

Val Leu Ser Val
690

<210> 17
<211> 697
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de la proteína de la envoltura consenso del subtipo B

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

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

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

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

Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro
 195 200 205

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

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

Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu
 245 250 255

Glu Val Val Ile Arg Ser Glu Asn Phe Thr Asn Asn Ala Lys Thr Ile
 260 265 270

Ile Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn
 275 280 285

Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile His Ile Gly Pro Gly Gln Ala Phe Tyr
 290 295 300

Thr Thr Gly Glu Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile
 305 310 315 320

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

Arg Glu Gln Phe Gly Asn Lys Thr Ile Val Phe Asn Gln Ser Ser Gly
 340 345 350

Gly Arg Pro Arg Ile Val Met His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe
 355 360 365

Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn Val Asn
 370 375 380

Gly Thr Trp Asn Asn Asn Thr Glu Gly Asn Asp Thr Ile Thr Leu Pro
 385 390 395 400

ES 2 706 501 T3

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

Met Tyr Ala Pro Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile
 420 425 430

Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Asn Asn Thr Asn Glu
 435 440 445

Thr Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg
 450 455 460

Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val
 465 470 475 480

Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala
 485 490 495

Val Gly Ile Gly Ala Met Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser
 500 505 510

Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu
 515 520 525

Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu
 530 535 540

Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu
 545 550 555 560

Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu
 565 570 575

Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Thr Val
 580 585 590

Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Asp Glu Ile Trp Asp
 595 600 605

Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Glu Arg Glu Ile Asp Asn Tyr Thr Ser
 610 615 620

Leu Ile Tyr Thr Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn
 625 630 635 640

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

ES 2 706 501 T3

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

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

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
690 695

<210> 18

<211> 687

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de la proteína de la envoltura consenso del subtipo C

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

10

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

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

ES 2 706 501 T3

660

665

670

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

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

5

<220>
 <223> Secuencia de la proteína de la envoltura consenso del subtipo D

10

<400> 19

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

ES 2 706 501 T3

Asn Cys Asn Thr Ser Ala Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Thr Phe
 195 200 205

Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu
 210 215 220

Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Lys Asn Val
 225 230 235 240

Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln
 245 250 255

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

Glu Asn Leu Thr Asn Asn Ala Lys Ile Ile Ile Val Gln Leu Asn Glu
 275 280 285

Ser Val Thr Ile Asn Cys Thr Arg Pro Tyr Asn Asn Thr Arg Lys Arg
 290 295 300

Ile Pro Ile Gly Leu Gly Gln Ala Phe Tyr Thr Thr Arg Gly Ile Ile
 305 310 315 320

Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Gly Ala Glu Trp Asn
 325 330 335

Lys Thr Leu Gln Gln Val Ala Lys Lys Leu Gly Asp Leu Leu Asn Lys
 340 345 350

Thr Thr Ile Ile Phe Lys Pro Ser Ser Gly Gly Arg Pro Arg Ile Thr
 355 360 365

Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser
 370 375 380

Arg Leu Phe Asn Ser Thr Trp Ser Lys Asn Ser Thr Ser Asn Ser Thr
 385 390 395 400

Lys Glu Asn Asn Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile
 405 410 415

Asn Met Trp Gln Gly Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Glu
 420 425 430

Gly Leu Ile Lys Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg

ES 2 706 501 T3

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

ES 2 706 501 T3

Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Leu
690 695

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

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

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

195 200 205

Ala Gly Arg Ser Gly Asp Ser Asp Glu Glu Leu Leu Lys Thr Val Arg
 210 215 220

Leu Ile Lys Phe Leu Tyr Gln Ser Asn Pro Pro Pro Ser Pro Glu Gly
 225 230 235 240

Thr Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Glu Arg Gln
 245 250 255

Arg Gln Ile Arg Ser Ile Ser Glu Trp Ile Leu Ser Thr Tyr Leu Gly
 260 265 270

Arg Pro Ala Glu Pro Val Pro Leu Gln Leu Pro Pro Leu Glu Arg Leu
 275 280 285

Thr Leu Asp Cys Asn Glu Asp Cys Gly Thr Ser Gly Thr Gln Gly Val
 290 295 300

Gly Ser Pro Gln Ile Leu Val Glu Ser Pro Ala Val Leu Glu Ser Gly
 305 310 315 320

Thr Lys Glu

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

5

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

10

<400> 21

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

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

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

5

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

10

<400> 23

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
260

ES 2 706 501 T3

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

10 <220>
<223> Epítipo inmunodominante de E6 del VPH

<400> 24

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

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

20 <220>
<223> Epítipo inmunodominante de E7 del VPH

<400> 25

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

25 <210> 26
<211> 142
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Secuencia consenso de E6 del VPH

<400> 26

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 27

<211> 97

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia consenso de E7 del VPH

<400> 27

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

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

ES 2 706 501 T3

20

25

30

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

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

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

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

Pro

5 <210> 28
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia líder de IgE

<400> 28

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

His Ser

15 <210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia de escisión proteolítica

<400> 29

Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
1 5

25 <210> 30
<211> 1766
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN de E1-E2 consenso del VHC genotipo 1a y 1b

35 <400> 30

ES 2 706 501 T3

gaattogcca ccatggactg gacctggatc ctgttcctgg tggccgctgc aacacgggtg 60
 cacagctacc aagtgaggaa tagcagcggc ctgtaccacg tgaccaacga ctgctccaac 120
 agcagcatcg tgtacgaggc cgccgacatg atcatgcaca cccccggctg tgtgccctgt 180
 gtgagagagg gcaacagctc cagatgctgg gtggcctga ccctaccgt ggccgccaga 240
 gatggcagcc tggccaccac caccctgagg agacacgtgg acctgcttgt gggcagcggc 300
 accctgtgta ggcocatgta tgtgggggat ctgtgtggca gcgtgtttct tgtgggccag 360
 ctgttcacct tcagccccag aaggcactgg accgtgcagg actgtaactg ctccatctac 420
 cccggccaca tcaccggcca cagaatggcc tgggacatga tgatgaactg gagccctacc 480
 accgcectgg tgggtgcca gctgctgaga atccctcagg ccatcgtgga catggtggcc 540
 ggagcccact ggggcgtgct ggccggcatc gcctacttca gcatggtggg caactgggcc 600
 aaggtgctcg tgggtgctgct gctgttcggc ggcgtggacg gcagaggcag gaagagaagg 660
 agcgagacc acgtgaccgg cggcaccggc ggcagaacca cagccggcct tgtgggcctg 720
 ttcaccctg gcgccaaagca gaacatccag ctgatcaaca ccaacggcag ctggcacatc 780
 aacagcaccg ccctgaactg taacgacagc ctgaacaccg gctggctggc cggcctgttc 840
 taccagcaca agttcaacag cagcggctgc cccgagagaa tggccagctg tagaccctg 900
 gatgagttcg ccagggctg gggcccatc acctacgcca atggcagcgg cctgaccag 960
 agaccctact gctggcaacta cggccccaga cctgtggca tcgtgcccgc caagagcgtg 1020
 tgtggccccg tgtactgctt caccctagc cccgtggtg tgggcaccac cgacagaagc 1080
 ggagccccca cctacagctg gggcgagaac gagaccgacg tgctggtgct gaacaacacc 1140
 agaccccccc tgggcaattg gttcggctgt acctggatga acagcaccgg cttcaccaaa 1200
 gtgtgtggcg cccctccctg tgtgatcggc ggagtgggca acaacacct gacctgccc 1260
 accgactgct tcagaaagca ccccgaggcc acctactcca gatgtggcag cggaccttg 1320
 ctgaccccca gatgtatggt ggactacccc tacaggctgt ggactaccc ctgtaccgtg 1380
 aacttcacca tcttcaaagt gaggatgtat gtggggggcg tggagcacag actggaggcc 1440
 gcctgtaatt ggaccagggg cgagagatgt gacctggagg accgggatag aagcgagctg 1500
 tcccctctgc tgctgtccac caccgagtgg caggtgctgc cttgtagctt caccacctg 1560
 cccgcectga gcaccggcct gatccacctg caccagaaca tcgtggacgt gcagtacctg 1620
 taaggagtgg gctctagcat cgtgtcctgg gccatcaagt gggagtacgt ggtgctgctg 1680
 ttctgctgc tggccgacgc cagagtgtgt agctgcctgt ggatgatgct gctgatcagc 1740
 caggccgagg cctgatgagc ggccgc 1766

<210> 31
 <211> 580

ES 2 706 501 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia de la proteína E1-E2 consenso del VHC genotipo 1a y 1b

<400> 31

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

```

465              470              475              480

Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu
              485              490

Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu Trp Gln Val Leu Pro Cys Ser
              500              505              510

Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr Gly Leu Ile His Leu His Gln
              515              520              525

Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr Gly Val Gly Ser Ser Ile Val
              530              535              540

Ser Trp Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val Val Leu Leu Phe Leu Leu Leu
545              550              555              560

Ala Asp Ala Arg Val Cys Ser Cys Leu Trp Met Met Leu Leu Ile Ser
              565              570              575

Gln Ala Glu Ala
              580

```

<210> 32
 <211> 192
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia consenso de E1 del VHC

10

<400> 32

ES 2 706 501 T3

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

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

<220>
 <223> Secuencia consenso de E2 del VHC

<400> 33

ES 2 706 501 T3

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

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

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

5

<400> 34

```

    ggtaccgaat tgcaccat ggactggacc tggatcctgt tcctggtggc cgctgccaca      60
    agagtgcaca gccccagggc ccccaggtgc agagccgtgc ggagcctgct gcggagccac    120
    taccgggagg tgctgccctt gccaccttc gtgcggaggc tgggccctca ggggtggcgg    180
    ctggtgcaga gaggcgacct tgcgccttc agagccctgg tggcccagtg cctggtgtgc    240
    gtgccctggg acgccagacc tccccctgcc gccctagct tccggcaggt gtectgctg    300
    aaagaactgg tggcccgggt gctgcagcgg ctgtgcgaga ggggcgcca gaacgtgctg    360
    gccttoggct tgcacctgct ggacggcgcc agagggcgcc ctcccgagga cttaccacc    420
    tccgtgagaa gctacctgcc caacacctg accgacgccc tgagaggcag cggcgcttgg    480
    ggctgctgc tgcgcagagt gggcgacgac gtgctggtgc acctgctggc cagatgcgcc    540
    ctgttcgtgc tggctgcccc cagctgcgcc taccaggtgt gcggcccacc cctgtaccag    600
    ctgggagccg ccaccagga cagacccct cctcacgctt ccggcccag gcggagactg    660
    ggctgcgagc gggcctgga ccacagcgtg cgggaggccg gcgtgccctt gggcctgcc    720
    gccctggcg ccagaagaag gggcggcagc gccagcagaa gcctgccctt gcccaagcgg    780
    cccagacgcg gagccgcccc tgagcccag agaacccccg tgggcccagg ctcttgggcc    840
    caccctggcc ggaccagagg ccccagcgc cggggttct gcgtggtgtc ccccgcaga    900
    cccgccgagg aagccacct cctggaaggc gccctgagcg gcaccaggca cagccacccc    960
    agcgtgggcc gccagacca cgcggacct cccagcact ccaggcccc caggccctgg    1020
    gacaccctt gccccctgt gtacgccgag accaagcaact tcctgtacag cagcggcgac    1080
    aaagagcagc tgcggcccag cttcctgctg tccagcctga ggccctccct gaccggcgt    1140
    aggcgcctgg tggagaccat ctttctgggc agccggccct ggatgcccgg cacccccagg    1200
    cggctgccc aagctgccc gcggtactgg cagatgaggc ctctgttctt ggaactgctg    1260
    ggcaaccacg cccagtgcc ctacggcgtg ctgctgaaaa cccactgcc cctgagagcc    1320
    gccgtgacct cagccgccc agtgtgcgc agagagaagc ctccggcag cgtggccgct    1380
    cccgaggaag aggacaccga ccccagcgc ctggtgcagc tgctgcggca gcacagcagc    1440
    ccttggcagg tgtacggctt cgtgcgggcc tgccctgagaa ggctggtgcc ccctggcctg    1500
    tggggcagca ggcacaacga gcggcggttt ctgcggaaca ccaagaagtt catcagcctg    1560
    gggaaacacg ccaagctgtc cctgcaggaa ctgacctgga agatgagcgt gcggggctgc    1620
    gcctggctga gaagatcccc tggcgtgggc tgcgtgctg ccgccagca cccgctgcgg    1680
    
```

ES 2 706 501 T3

gaggaaatcc tggccaagtt cctgcactgg ctgatgagcg tgtacgtggt ggagctgctg 1740
agatccttct tctacgtgac cgagaccacc ttccagaaga actacctgtt cttctaccgg 1800
aagagcgtgt ggagcaagct gcagagcatc ggcacccggc agcacctgaa gcgggtgcag 1860
ctgagagagc tgtccgaggc cgaagtgagg cagcaccggg aggccagacc tgccctgctg 1920
accagccggc tgcggttcat ccccaagccc gacggcctgc ggcccatcgt gaacatggac 1980
tacgtggtgg gcgccaggac cttccggcgg gagaagcggg ccgagcggct gacctcgagg 2040
gtgaaggccc tgttcagcgt gctgaactac gagcgggcca ggccggccagg cctgctgggc 2100
gccagcgtgc tgggcctgga cgacatccac cgggcctggc ggaccttcgt gctgagagtg 2160
cgggccagg acccccctcc cgagctgtac ttcgtgaagg tggacgtgac aggcgcctac 2220
gacaccatcc cccaggaccg gctgaccgag gtgatcgcca gcacatcaa gcccagaac 2280
acctactgcg tgcggagata cgccgtggtg cagaaggccg cccacggcca cgtgcggaag 2340
gccttcaaga gccacgtgag caccctgacc gacctgcagc cctacatgcg gcagttcgtg 2400
gccacactgc aggaaaccag ccccctgcgg gatgccgtgg tgatcgagca gacgagcagc 2460
ctgaacgagg ccagcagcgg cctgttcgac gtgttcctga gattcatgtg ccaccacgcc 2520
gtgcggatcc ggggcaagag ctacgtgcag tgccagggca tcccacaggg cagcatcctg 2580
tccaccctgc tgtgctccct gtgctacggc gacatggaaa acaagctgtt cgccggcacc 2640
aggcgggacg gactgctgct gagactggtg gacgacttcc tgctggtgac cccccacctg 2700
accacgcca agaccttct gcggaccctg gtgcgcggcg tgcccagta cggctgcgtg 2760
gtgaacctga gaaagaccgt ggtgaacttc cccgtggagg acgaggccct gggcggcaca 2820
gccttcgtgc agatgcctgc ccatggactg ttcccttggc gcgggctgct gctggacacc 2880
cggaccctgg aagtgcagag cgactacagc agctacgcc ggaccagcat ccgggcctcc 2940
ctgacctca acaggggctt caaggccggc aggaacatgc ggccggaagct gtttggcgtg 3000
ctgcggctga agtgccacag cctgtttctg tacctgcagg tgaacagcct gcagaccgtg 3060
tgcaccaaca tctacaagat cctgctgctg caggcctacc ggttccacgc ctgcgtgctg 3120
cagctgccct ttcaccagca ggtgtggaag aaccctacct tcttcctgcg ggtgatcagc 3180
gacaccgcca gcctgtgcta cagcatcctg aaggccaaga acgcccgcac gagcctgggc 3240
gccaaaggag ccgcccggacc tctgcccagc gagccgtgc agtggtgtg ccaccaggcc 3300
tttctgctga agctgacccg gcaccgggtg acctacgtgc ccctgctggg cagcctgcgg 3360
accgcccaga cccagctgtc ccggaagctg cctggcacca ccctgacagc cctggaagcc 3420
gccgccaacc ccgccctgcc ctccgacttc aagaccatcc tggactacct ctacgacgtg 3480
cccgactacg cctgatgagc ggccgcgagc tc 3512

ES 2 706 501 T3

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

5

<400> 35

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

Phe Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly
 485 490 495

Ser Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile
 500 505 510

Ser Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys
 515 520 525

Met Ser Val Arg Gly Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly
 530 535 540

Cys Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys
 545 550 555 560

Phe Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser
 565 570 575

Phe Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Tyr Leu Phe Phe
 580 585 590

Tyr Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln
 595 600 605

His Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg
 610 615 620

Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
 625 630 635 640

Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val
 645 650 655

Val Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr
 660 665 670

Ser Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg
 675 680 685

Arg Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His
 690 695 700

Arg Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro
 705 710 715 720

Pro Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr

ES 2 706 501 T3

```

              725                      730                      735
Ile Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro
          740                      745                      750

Gln Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala
          755                      760                      765

His Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr
          770                      775                      780

Asp Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr
785                      790                      795

Ser Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn
          805                      810                      815

Glu Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His
          820                      825                      830

His Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile
          835                      840                      845

Pro Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly
          850                      855                      860

Asp Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu
865                      870                      875

Leu Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His
          885                      890                      895

Ala Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly
          900                      905                      910

Cys Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp
          915                      920                      925

Glu Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu
          930                      935                      940

Phe Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln
945                      950                      955

Ser Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr
          965                      970                      975
    
```

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- <400> 36

ES 2 706 501 T3

atggaaaaga tegtgtgct gttcgccatc gtgagcctgg tgaagagcga ccagatctgc 60
 atcggctacc acgccaacaa cagcaccgag caggtggaca ccatcatgga aaaaaacgtg 120
 accgtgaccc acgcccagga catcctggaa aagaccacaca acggcaagct gtgcgacctg 180
 gacggcgtga agcccctgat cctgcgggac tgcagcgtgg ccggctggct gctgggcaac 240
 cccatgtgcy acgagttcat caacgtgcc gagtggagct acatcgtgga gaaggccaac 300
 cccgtgaacg acctgtgcta ccccgcgac ttcaacgact acgaggaact gaagcacctg 360
 ctgtcccgga tcaaccactt cgagaagatc cagatcatcc ccaagagcag ctggtccagc 420
 cacgaggcca gcctggggct gagcagcgcc tgcccatacc agggcaagtc cagcttcttc 480
 cggaacgtgg tgtggctgat caagaagaac agcacctacc ccaccatcaa gcggagctac 540
 aacaacacca accaggaaga tctgctggtc ctgtggggca tccaccaccc caacgacgcc 600
 gccgagcaga ccaagctgta ccagaacccc accacctaca tcagcgtggg caccagcacc 660
 ctgaaccagc ggctggtgcc ccggatcgcc acccgtcca aggtgaacgg ccagagcggc 720
 cggatggaat tcttctggac catcctgaag cccaacgatg ccatcaactt cgagagcaac 780
 ggcaacttca togccccga gtacgcctac aagatcgtga agaagggcga cagcaccatc 840
 atgaagagcg agctggaata cggcaactgc aacaccaagt gccagacccc catgggcgcc 900
 atcaacagca gcatgccctt ccacaacatc cccccctga ccatcggcga gtgccccaaag 960
 tacgtgaaga gcaacaggct ggtgctggcc accggcctgc ggaacagccc ccagcgggag 1020
 cggcgggccc ccgcccgggg cctgtteggc gccatcgccc gcttcatcga gggcggctgg 1080
 cagggcatgg tggacgggtg gtacggctac caccacagca atgagcaggg cagcggctac 1140
 gccgccgaca aagagagcac ccagaaggcc atcgacggcg tcaccaacaa ggtgaacagc 1200
 atcatcgaca agatgaacac ccagttcgag gccgtgggcc gggagttcaa caacctggaa 1260
 cggcggatcg agaacctgaa caagaaaatg gaagatggct tcctggacgt gtggacctac 1320
 aacgccgagc tgctggtgct gatggaaaac gagcggaccc tggacttcca cgacagcaac 1380
 gtgaagaacc tgtacgacaa agtgcggtg cagctgcggg acaacgcca agagctgggc 1440
 aacggctgct tcgagttcta ccacaagtgc gacaacgagt gcatggaaag cgtgcggaac 1500
 ggcacctacg actaccccca gtacagcgag gaagcccggc tgaagcggga ggaaatcagc 1560
 ggcgtgaaac tggaaagcat cggcatctac cagatcctga gcatctacag caccgtggcc 1620
 agcagcctgg ccctggccat catggtggcc ggctgagcc tgtggatgtg cagcaacggc 1680
 agcctgcagt gccggatctg catctag 1707

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

ES 2 706 501 T3

<220>

<223> Secuencia consenso de HA de gripe H5N1

<400> 37

5

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 706 501 T3

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
 275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 325 330 335

Pro Gln Arg Glu Arg Arg Ala Ala Ala Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
 340 345 350

Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 355 360 365

Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
 370 375 380

Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
 385 390 395 400

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 405 410 415

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
 420 425 430

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
 435 440 445

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
 450 455 460

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
 465 470 475 480

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
 485 490 495

Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
 500 505 510

ES 2 706 501 T3

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

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

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

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

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

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

<400> 38

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

ES 2 706 501 T3

```

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

```

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

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

<400> 39

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

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

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

10 <220>
 <223> Secuencia consenso de M1 de gripe H1N1&H5N1

<400> 40

```

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

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

ES 2 706 501 T3

<220>

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

<400> 41

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

225				230				235				240			
Pro	Ser	Ser	Ser	Ala	Gly	Leu	Arg	Asp	Asp	Leu	Leu	Glu	Asn	Leu	Gln
				245				250						255	
Ala	Tyr	Gln	Lys	Arg	Met	Gly	Val	Gln	Met	Gln	Arg	Phe	Lys	Tyr	Pro
			260					265					270		
Tyr	Asp	Val	Pro	Asp	Tyr	Ala									
		275													

5
<210> 42
<211> 1700
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Secuencia consenso de M2E-NP de gripe H5N1
<400> 42

ES 2 706 501 T3

ggtaccgaat tgcgccacat ggactggacc tggatcctgt tcttgggtgc tgccgccacc 60
 aggggtgcaca gcagcctgct gaccgaggtg gagacccccca cccggaacga gtggggctgc 120
 cgggtgcagcg acagcagcga cgggggcagg aagcggagaa gcgccagcca gggcaccaag 180
 cggagctacg agcagatgga aacagggcggc gagcggcaga acgccaccga gatccggggc 240
 agcgtgggca gaatggtcgg cggcatcggc cggttctaca tccagatgtg caccgagctg 300
 aagctgtccg actacgaggg cggctgata cagaacagca tcaccatcga gcggatggtg 360
 ctgtccgcct tcgacgagcg gcggaacaga tacctggaag agcaccaccag cgcggcaag 420
 gacccaaga aaaccggcgg acccatctac cggcggaggg acggcaagtg ggtgcgggag 480
 ctgatcctgt acgacaaaga ggaaatccgg cggatctggc ggcaggccaa caacggcag 540
 gacgccacag cggcctgac ccacctgatg atctggcaca gcaacctgaa cgacgccacc 600
 taccagcggga caagggctct ggtccggacc ggcattggacc cccggatgtg cagcctgatg 660
 cagggcagca cactgcccag aagaagcggg gccgctggcg cagccgtgaa gggcgtgggc 720
 accatggtga tggaaactgat ccggatgata aagcggggca tcaacgaccg gaatTTTTGG 780
 aggggcgaga acggcagggc gaccocggatc gcctacgagc ggatgtgcaa catcctgaag 840
 ggcaagtTCC agacagccgc ccagcggggc atgatggacc aggtccggga gagccggaac 900
 cccggcaacg ccgagatcga ggacctgatc ttcttggcca gaagcgcctt gatcctgcgg 960
 ggcagcgtgg ccacaagag ctgcctgccc gcctgcgtgt acggactggc cgtggccagc 1020
 ggctacgact tcgagcggga gggctacagc ctggctggca tcgaccctt cggctgctg 1080
 cagaactccc aggtgttcag cctgatccgg cccaacgaga accccgcca caagtcccag 1140
 ctggtctgga tggcctgcca cagcgcggcc ttcgaggatc tgagagtgag cagcttcac 1200

 cggggcacca gagtgggtgc caggggccag ctgtccacca ggggcgtgca gatcgccagc 1260
 aacgagaaca tggaaagccat ggacagcaac accctggaac tgcggagccg gtactgggccc 1320
 atccggacca gaagcggcgg caacaccaac cagcagcggg ccagcgcggg acagatcagc 1380
 gtgcagccca ctttctccgt gcagcggaac ctgcccttcg agagggccac catcatggcc 1440
 gccttcaccg gcaacaccga gggccggacc agcgacatgc ggaccgagat catcaggatg 1500
 atggaaagcg ccaggcccgga ggacgtgagc ttccagggca ggggcgtgtt cgagctgtcc 1560
 gatgagaagg ccaccaaccc catcgtgccc agcttcgaca tgaacaacga gggcagctac 1620
 ttcttcggcg acaacgcoga ggaatacagc aactaccctt acgacgtgcc cgactacgcc 1680
 tgatgagcgg ccgcgagctc 1700

<210> 43
 <211> 554
 <212> PRT

ES 2 706 501 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

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

5

<400> 43

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 706 501 T3

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

ES 2 706 501 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:2 y fragmentos de la SEQ ID NO:2 que comprenden 600 o más aminoácidos de la SEQ ID NO:2, en donde la secuencia de aminoácidos induce una respuesta inmune frente al VIH.
2. La proteína de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:16.
- 10 3. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de la reivindicación 1.
4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3 que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:1; fragmentos de la SEQ ID NO:1 que comprenden 1.890 o más nucleótidos de la SEQ ID NO:1; y secuencias que tienen al menos 90 % de similitud con la SEQ ID NO:1.
- 15 5. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4 que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95 % de similitud con la SEQ ID NO:1; una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 98 % de similitud con la SEQ ID NO:1; y una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99 % de similitud con la SEQ ID NO:1.
- 20 6. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4 que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:16.
7. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde dicha molécula es un plásmido.
- 25 8. Una vacuna recombinante que comprende una proteína de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.
- 30 9. Un patógeno atenuado vivo que comprende una proteína de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.
10. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.
- 35 11. Un compuesto farmacéutico inyectable que comprende una proteína de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.
- 40 12. Una composición de la reivindicación 10 o la reivindicación 11 para su uso en un método de inducir una respuesta inmune en un individuo frente al VIH.

```

1 MDWTWILFLVAAATRVHSRVKGIKKNYQHLWRWGTMLLGMLMTCSAAEKLLWVTYYGVPVWKEATTTILFCASDAKAYDTEVHNWATHAC EY2E1-B
1 MDWTWILFLVAAATRVHS-----E-EKLWVTYYGVPVWKEATTTILFCASDAKAHHAHAHNWATHAC EK2P-B

91 VPTDNPQEVLENVTFNMMKNNMVEQMHEIIISLWQSLKPCVKLTPLCVTLINCT-----DLSGEMKEKEIKMCSFN EY2E1-B
63 VPTDNPQEVILENVEKYNMWNMVDQMHEIIISLWQSLKPCVKLTPLCVTLINCTNATYTNSDSKNSTSNSSLEDSKGDMM-CSEF EK2P-B

167 ITTSIRDKVQKEYALFYKLDVVPIDNDNTSYRLISONTSVITQACPQKVSFEPIPHYCAPAGFAILKCNCKKFNGTGPTNVSTVQCTHG EY2E1-B
152 VTTSIDKKKTEYAIIDKLDVMNIGNG--RYTLNONTSVITQACPQKVSFEPIPHYCTPAGYAILKCNCKKFNGTGPTNVSTIQCTHG EK2P-B

          bucle V1
          * * * * *
257 IRPVYSTQLLLNGSLAEE-EVIRSENFNNAKIIIVQLNESVEINCTRPNNTRKSIHIGPGQAFYTTGEIIGDIRQAHCNISRAKWN EY2E1-B
240 IKPVYSTQLLLNGSLAEGGEVIRSENLIDNAKIIIVQLKEPVEINCTRPNNTRKSIHMGPGAIFYARGEVIGDIRQAHCNISRRW EY2P-B

          bucle V2
          * * * * *
346 TLKQIVKKLREQFNKIVFNQSSGGRPIVMHSFNGGEEFFYCNLTQLFNSTWNVGTWNNNTEG---NDITLPCRDKIINMMQEV EY2E1-B
330 TLKQIAKKLREQF-NKTIISLQSSGDLEIVMHTFNGGEEFFYCNLTQLFNSTWNVNDTWNNTAGSNNETITLPCRDKIINRWQEV EY2P-B

433 KAMYAPPARGQIRCSSNITGLLLTRDGGNNNTETEIFRPGGDMRDNRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAKRRVQREKRAVIGIAMFL EY2E1-B
419 KAMYAPPISGPINCLSNITGLLLTRDGGDNN-NIETFRPGGDMRDNRSELYKYKVVRIEPLGIAPTAKRRVQREKRAVIGIAMFL EK2P-B

          Sitio de escisión
          *
523 GFLGAPGSTMGAASMTLVQARQLLSGIVQDQNNLLRAIEAQHLLQLTWGKIQQLQARVLAVERYLKDQQLLGWGCSSGLICTTTPW EY2E1-B
508 GFLGAAGSTMGAASVTLVQARQLLSGIVQDQNNLLRAIEAQHLLQLTWGKIQQLQARVLAVERYLKDQQLLGWGCSSGLICTTNPW EK2P-B

613 NASWSNKSLEIWDNMTMWEWEREIDNYTSLIYTLIEESQNGEKNEQELLELDKWAASLWNVFDITNWLWYIKIFIMIVGGLIGLRIVFA EY2E1-B
598 NASWSNKSLEIWHNMTMWEWEREIDNYTKLIYTLIEASQIQGEEKNEQELLELDKWAASLWNVFDISKWLWYIGVFIIIVIGGLVGLKIVFA EK2P-B

703 VLSIYPYDVPDYA .....
688 VLSIVNRVQVTRV .....
          .....
          EY2E1-B
          EK2P-B
    
```

FIG. 1

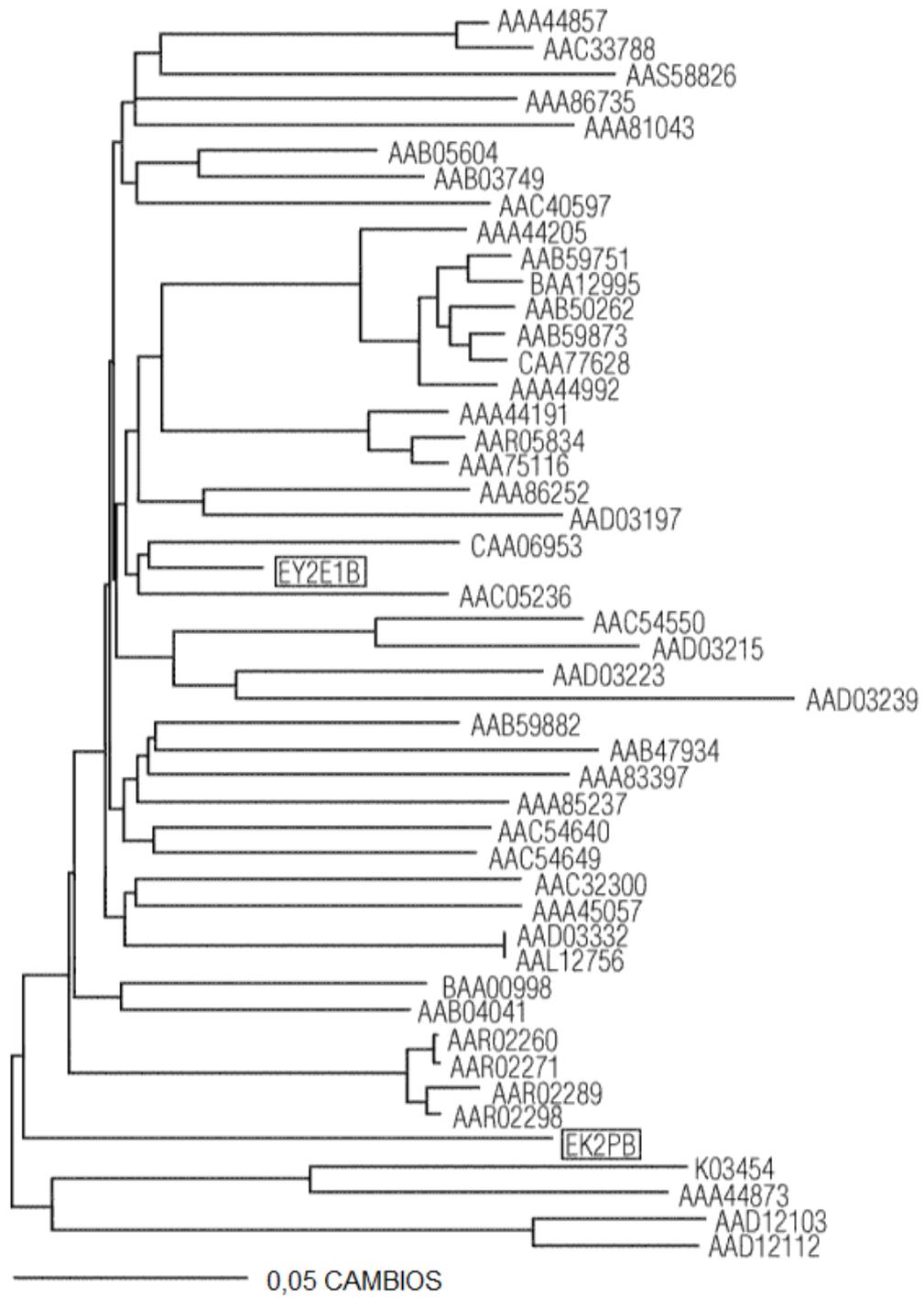


FIG. 2

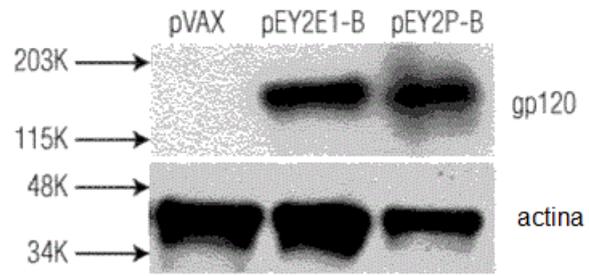


FIG. 3A

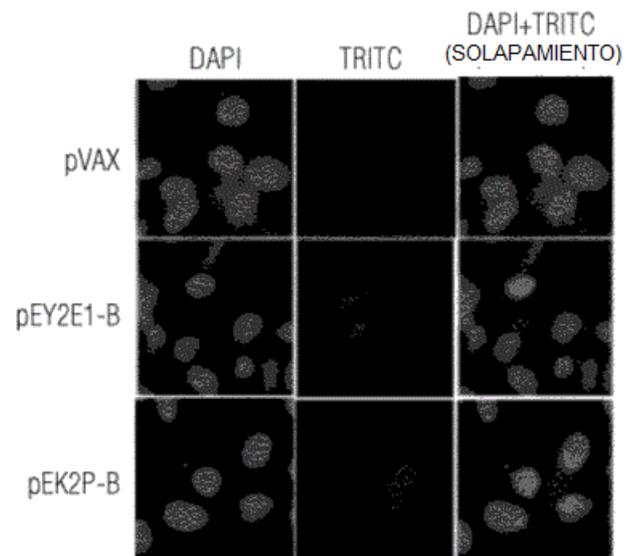


FIG. 3B

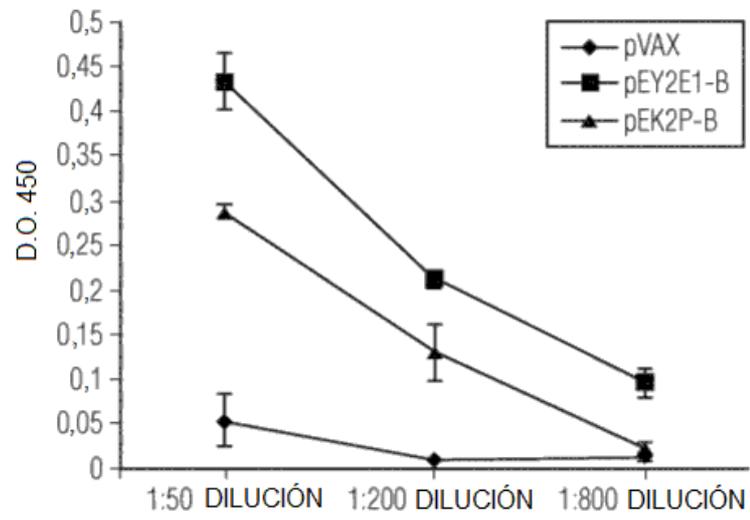


FIG. 4A

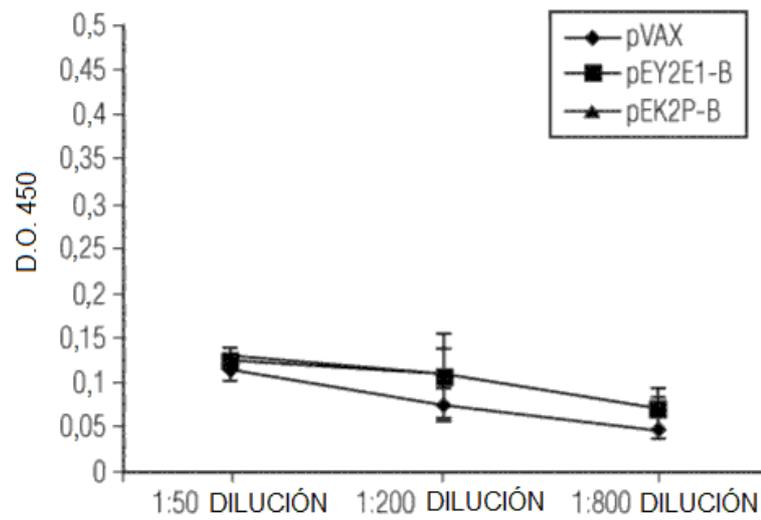


FIG. 4B

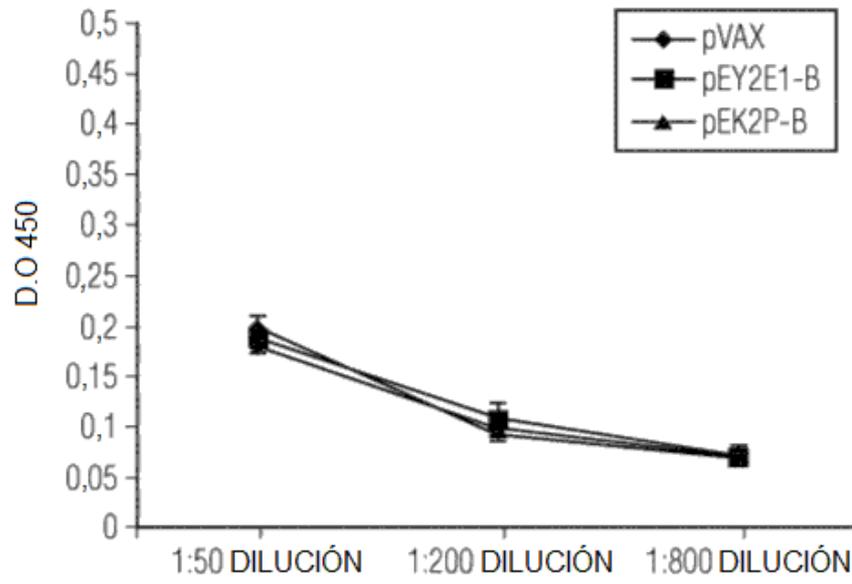


FIG. 4C

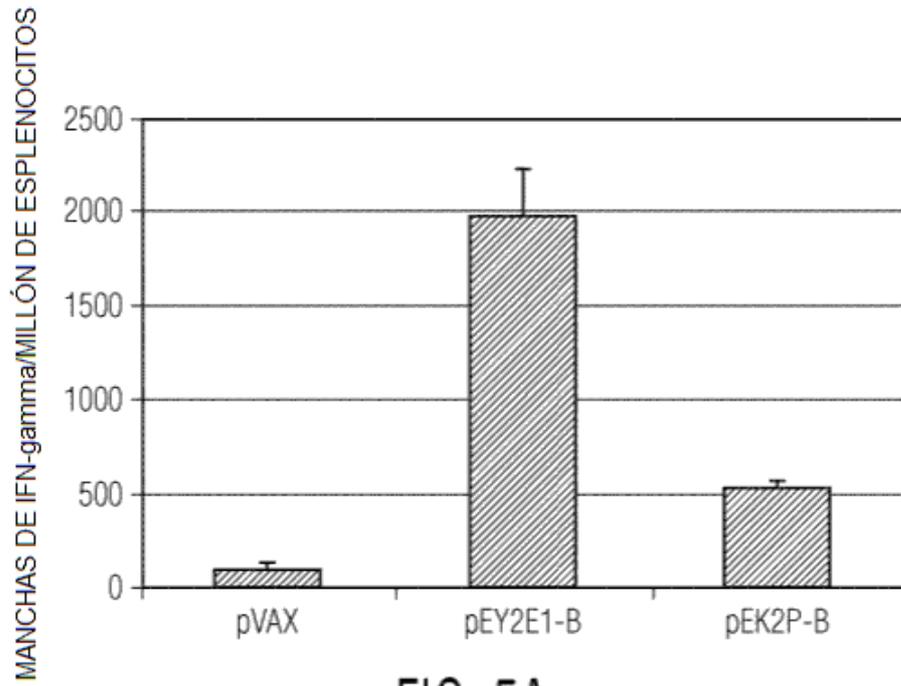


FIG. 5A

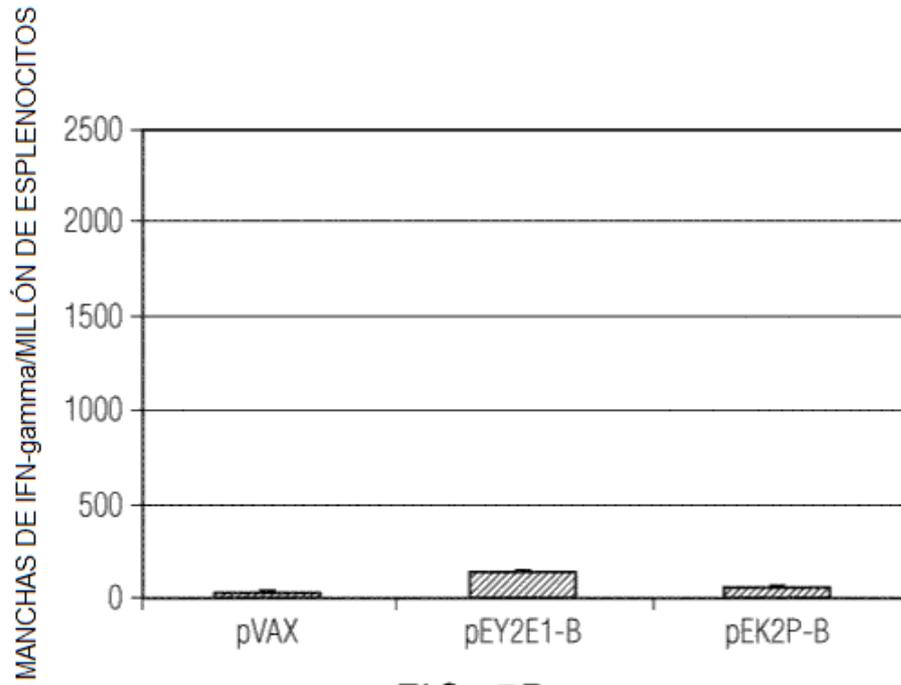


FIG. 5B

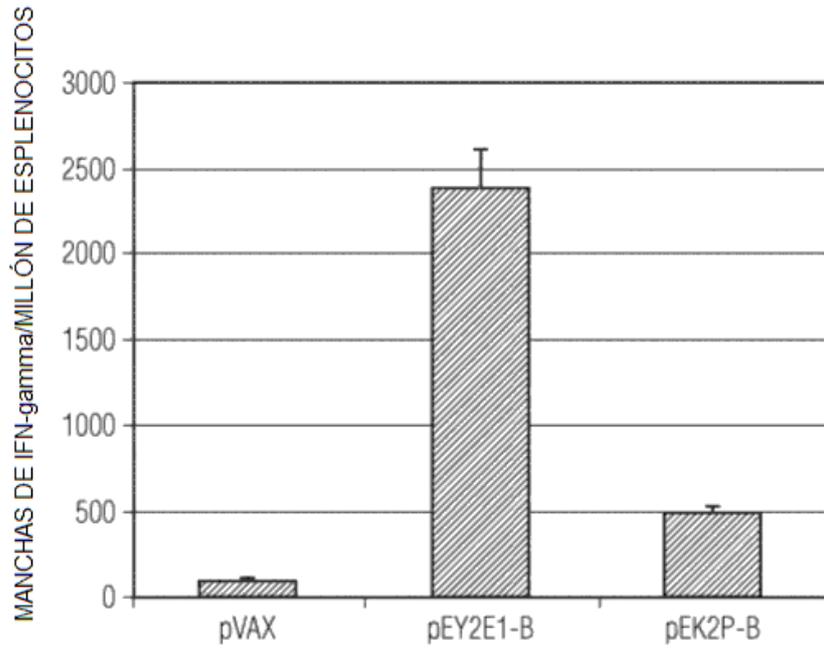


FIG. 5C

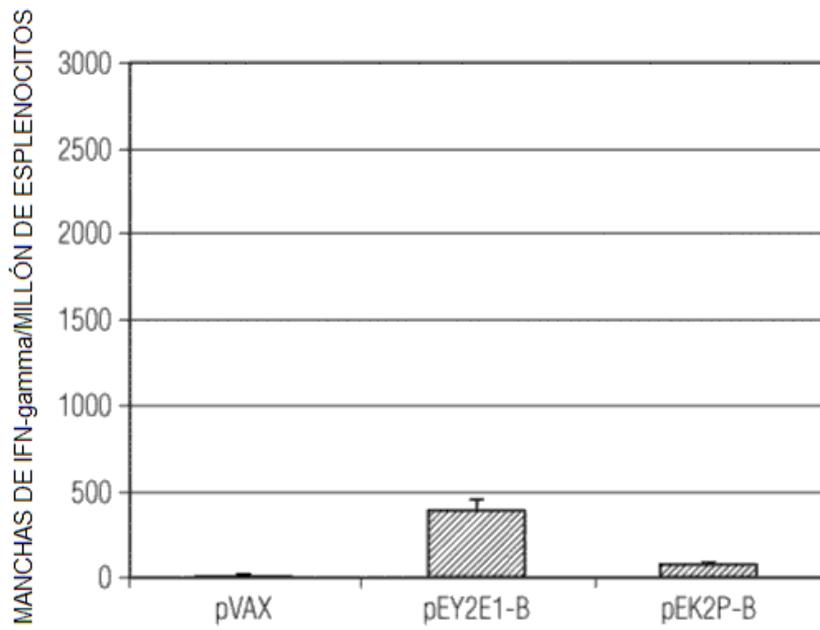


FIG. 5D

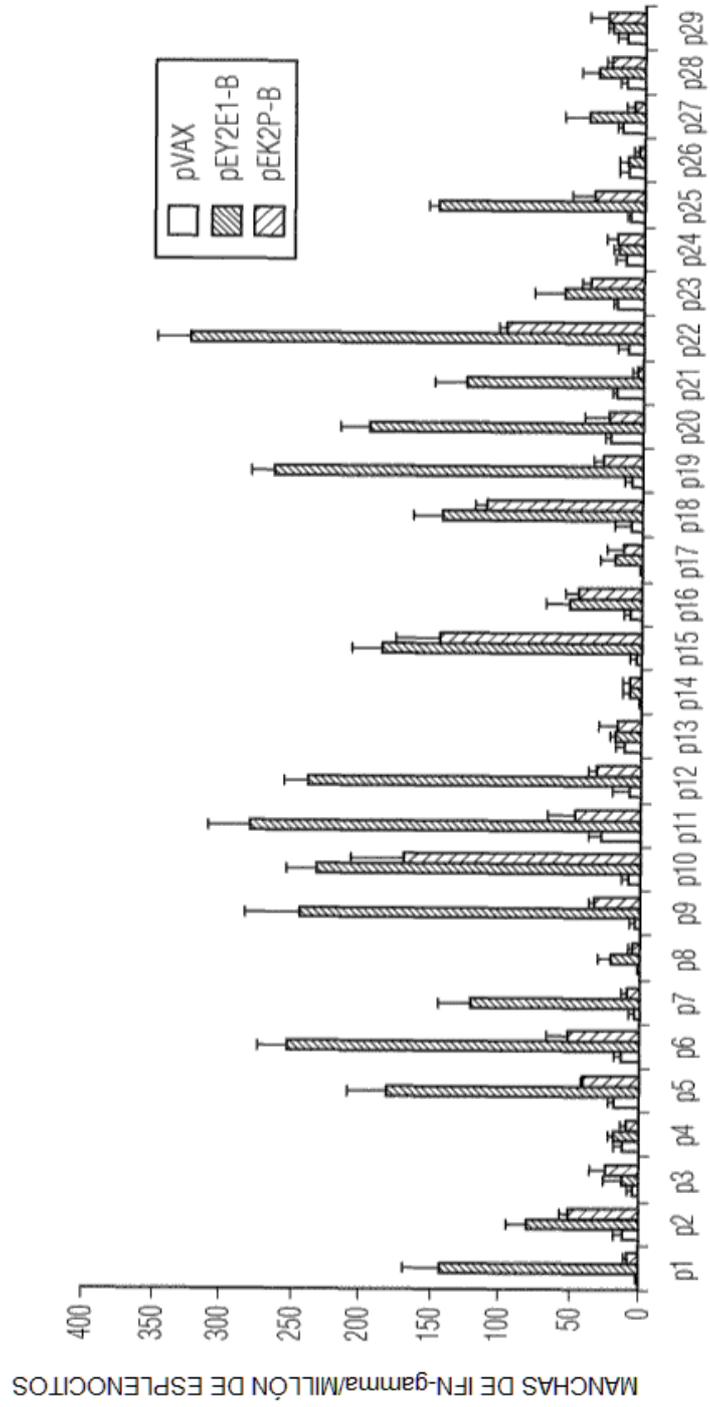


FIG. 5E

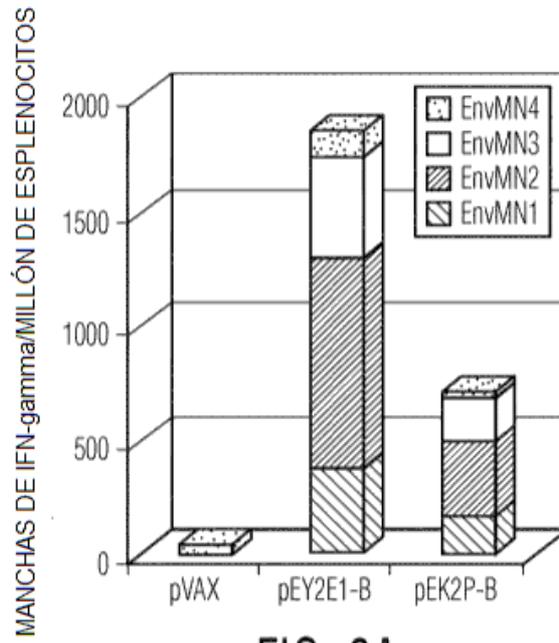


FIG. 6A

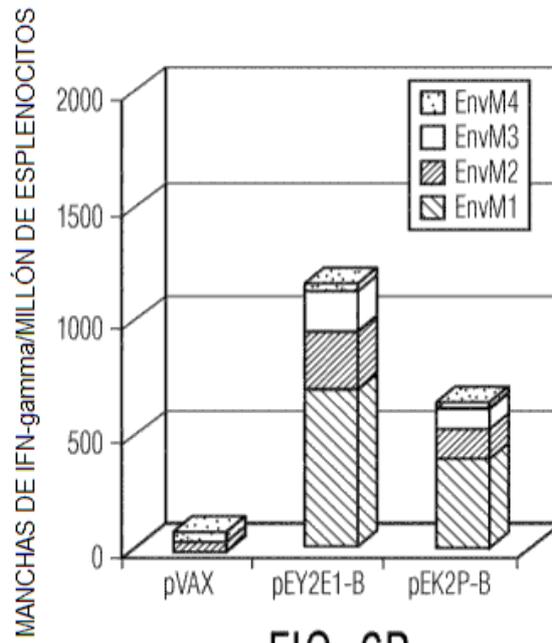


FIG. 6B

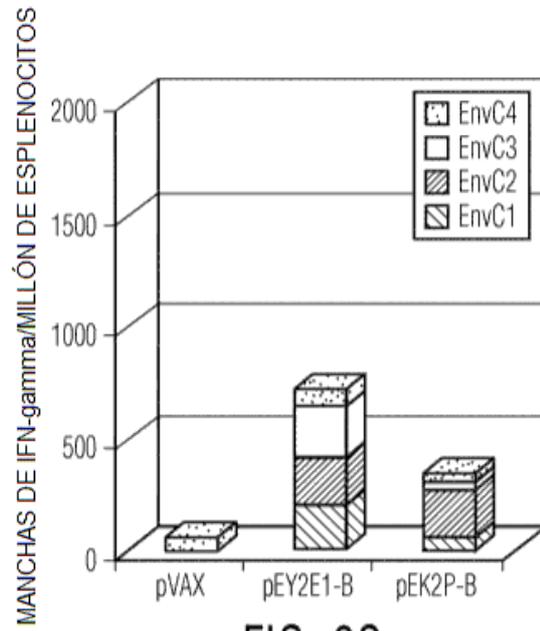


FIG. 6C

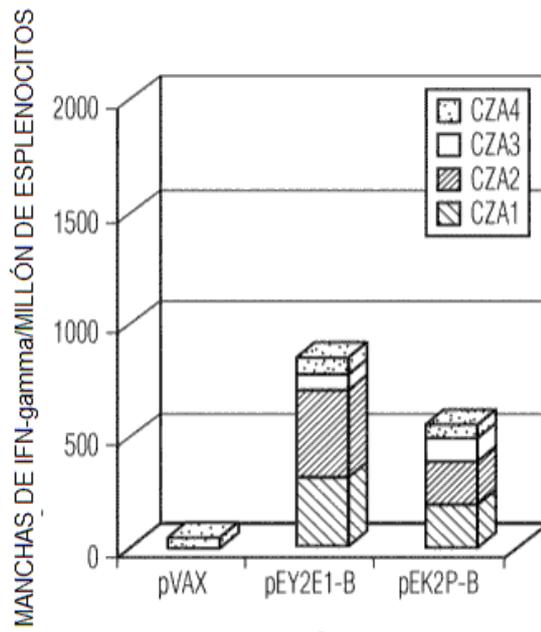


FIG. 6D

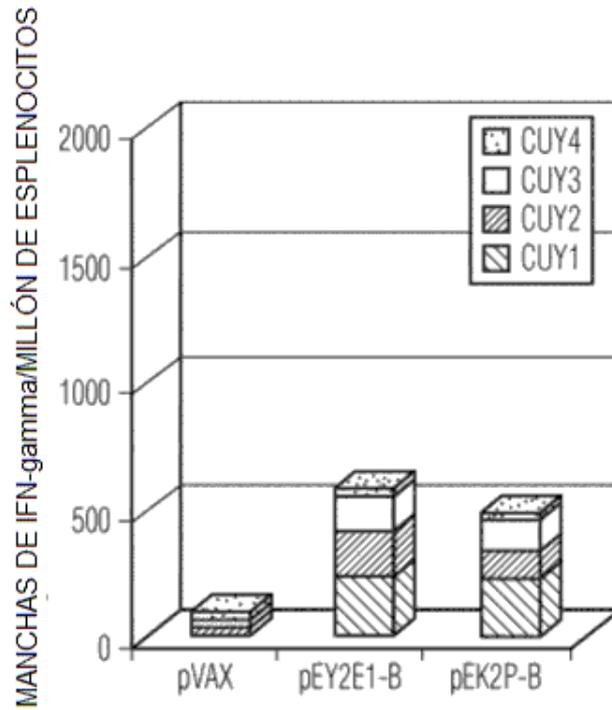


FIG. 6E

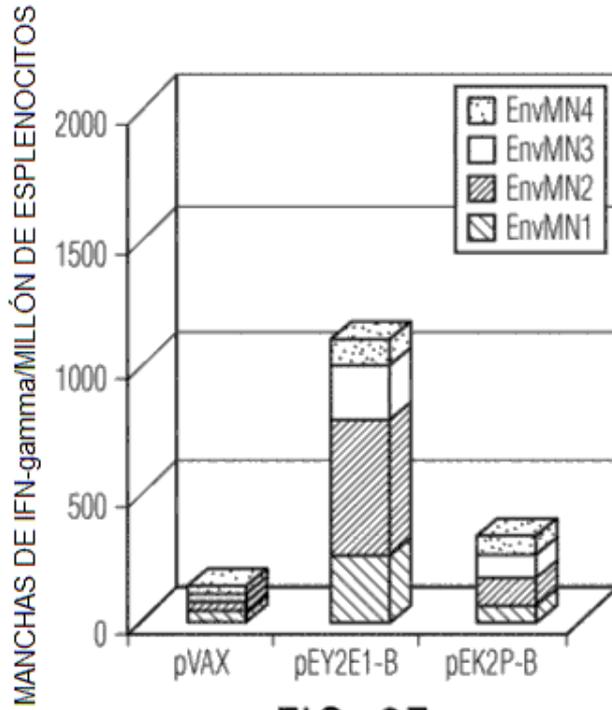


FIG. 6F

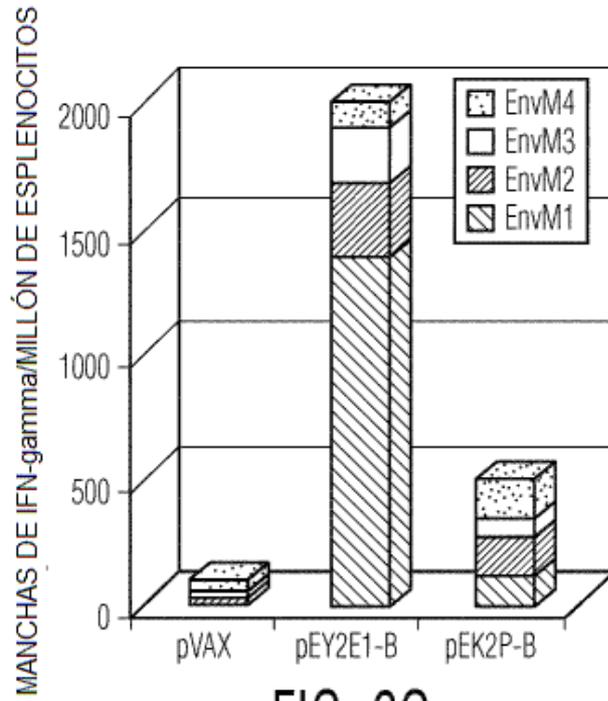


FIG. 6G

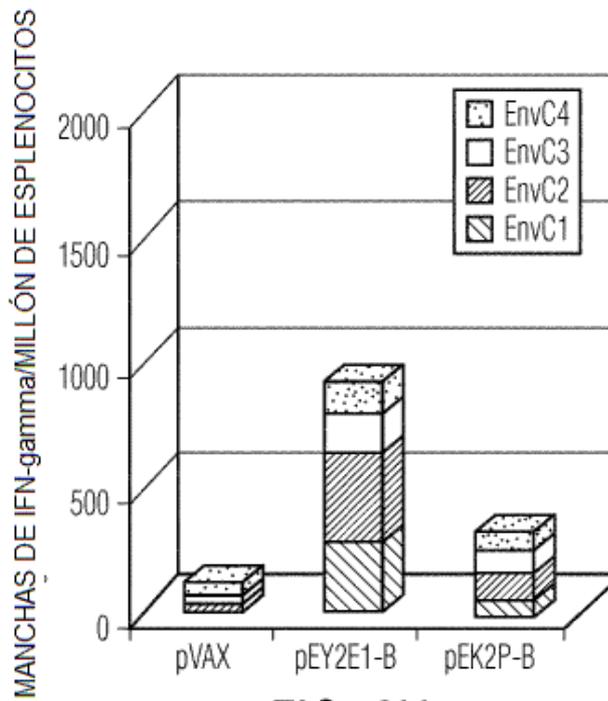


FIG. 6H

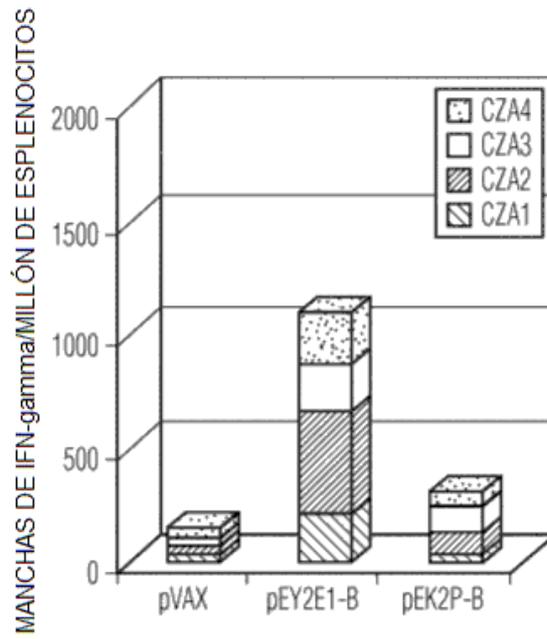


FIG. 6I

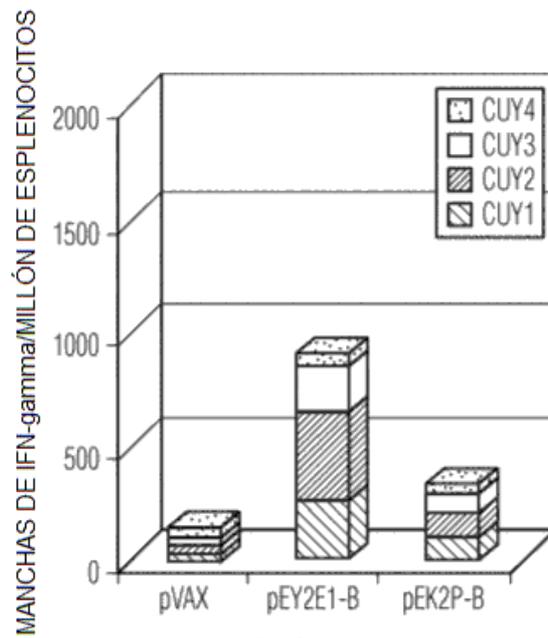


FIG. 6J

ELISpot de IFN-gamma específico a env del subtipo B MN en ratones Balb/C

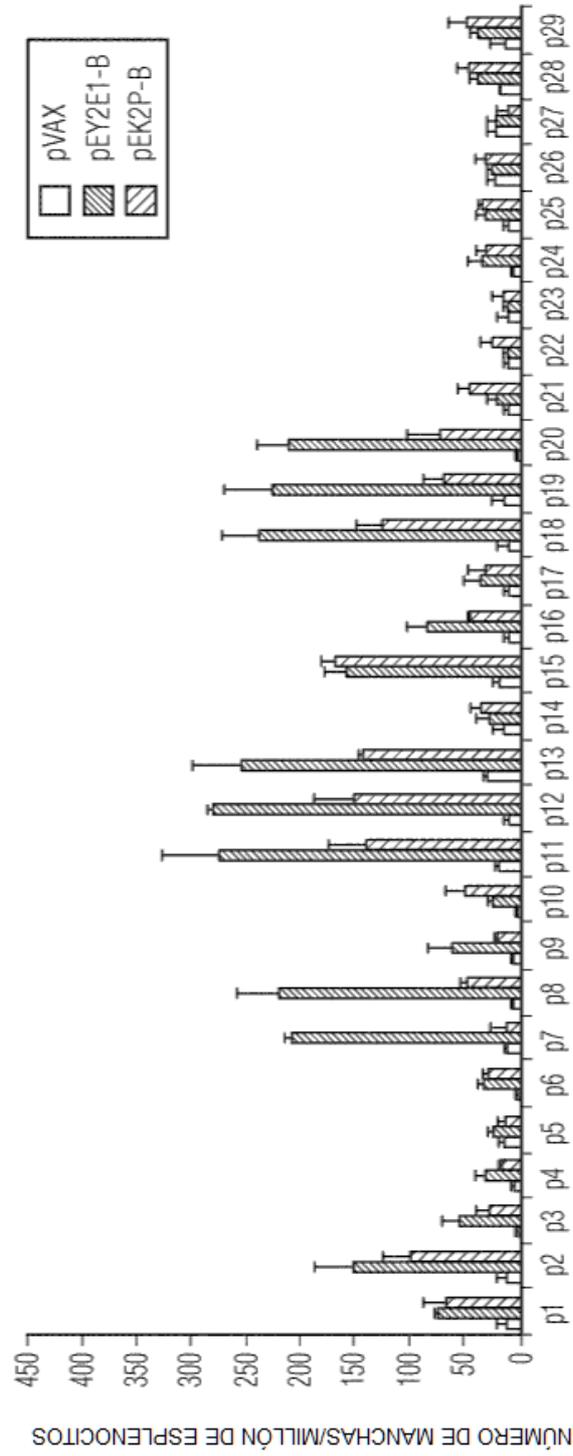


FIG. 7A

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



FIG. 7B

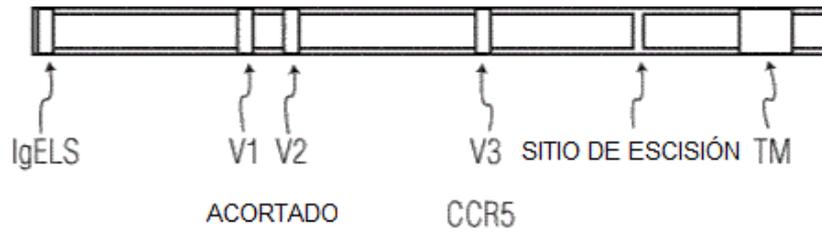


FIG. 8

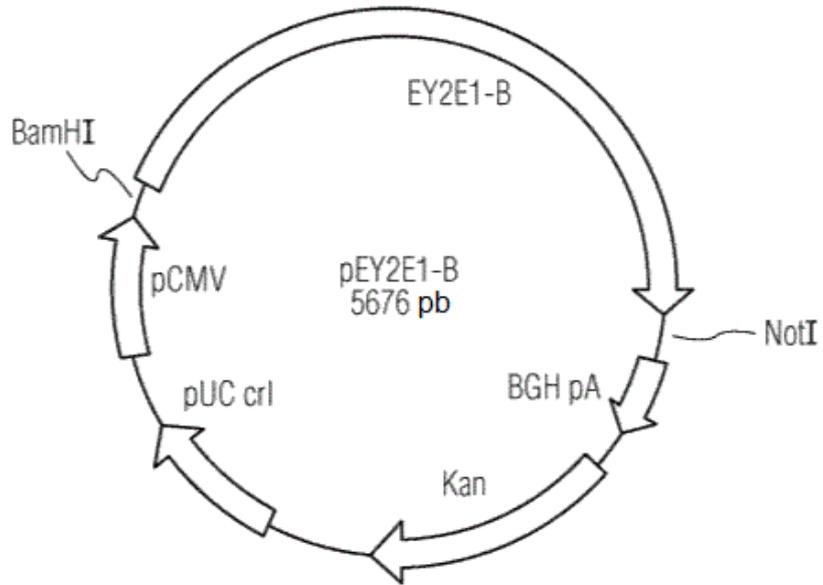


FIG. 9

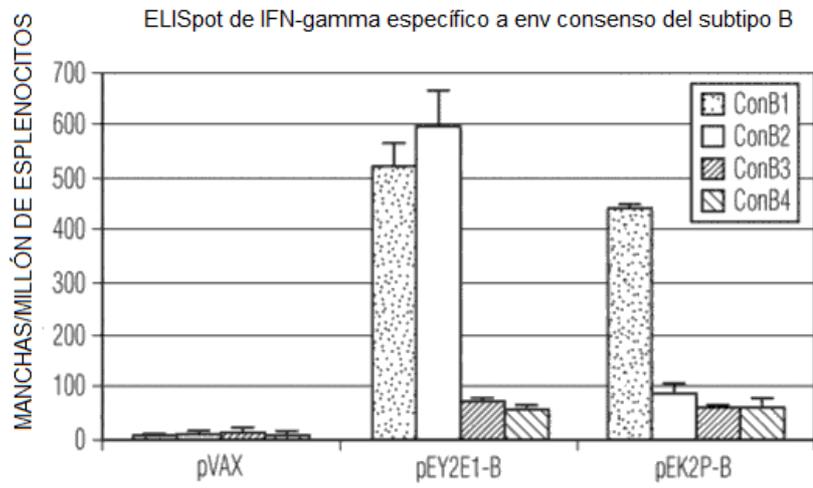


FIG. 10A

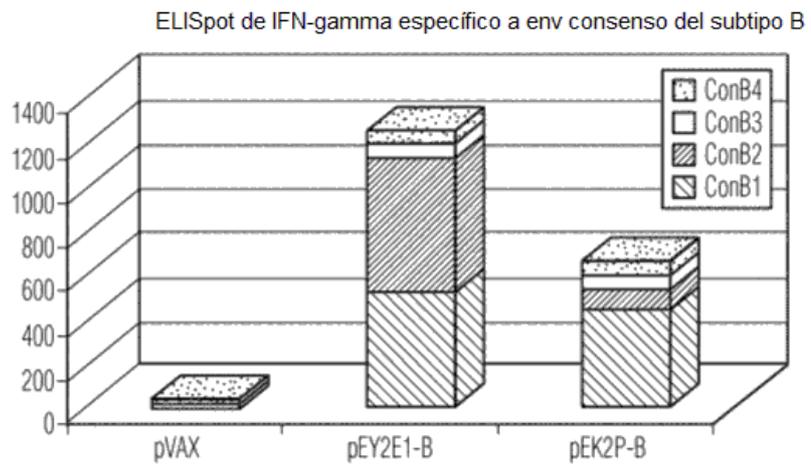


FIG. 10B

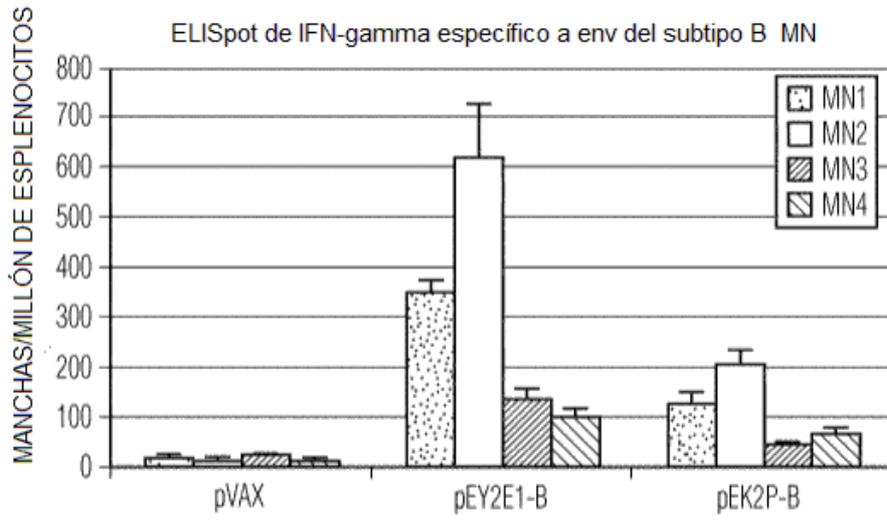


FIG. 11A

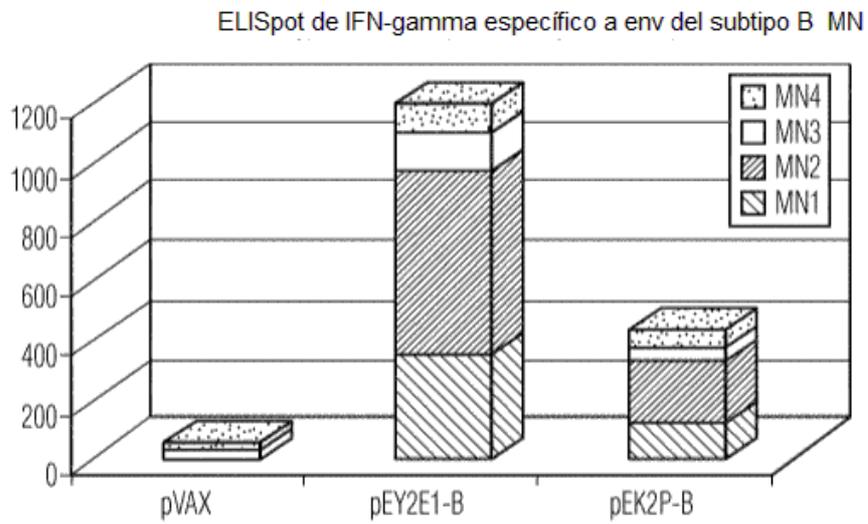


FIG. 11B

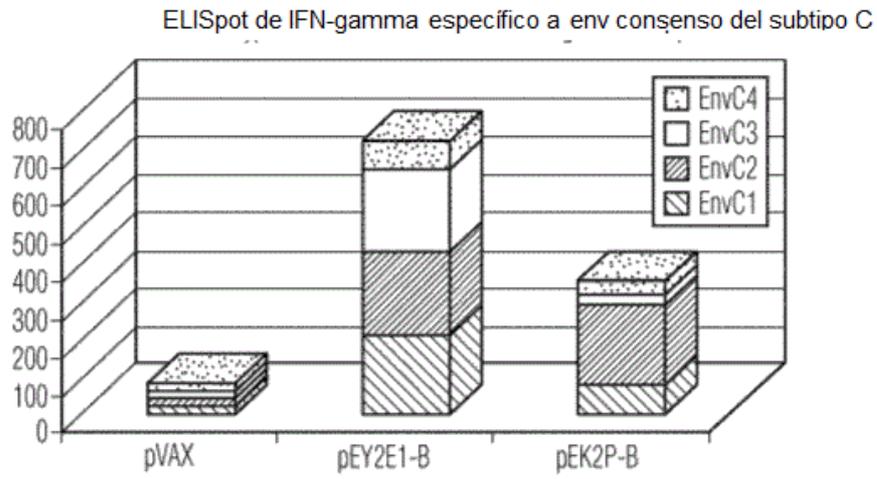


FIG. 12A

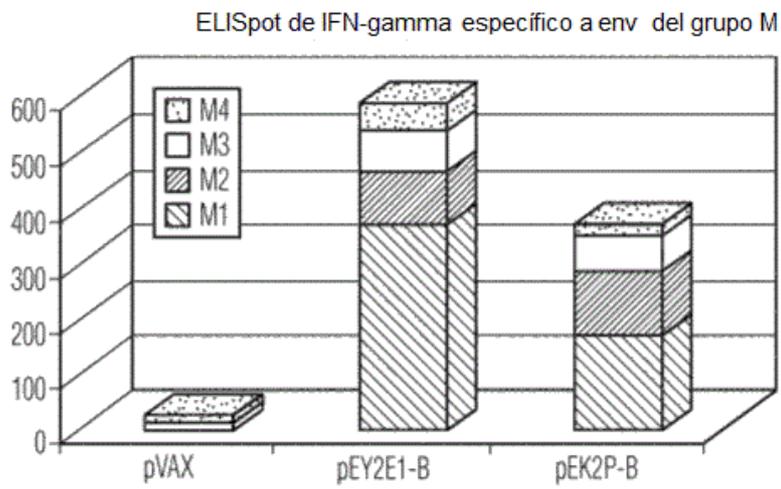


FIG. 12B

ELISpot de IFN-gamma especifico a env del subtipo C C1.C.UY.01 TRA3011

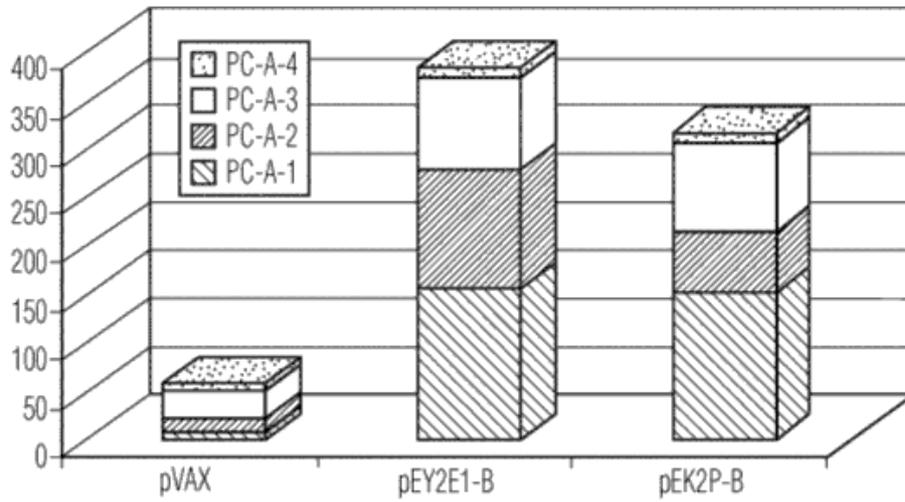


FIG. 12C

ELISpot de IFN-gamma especifico a env del subtipo C C.ZA.01.J54Ma

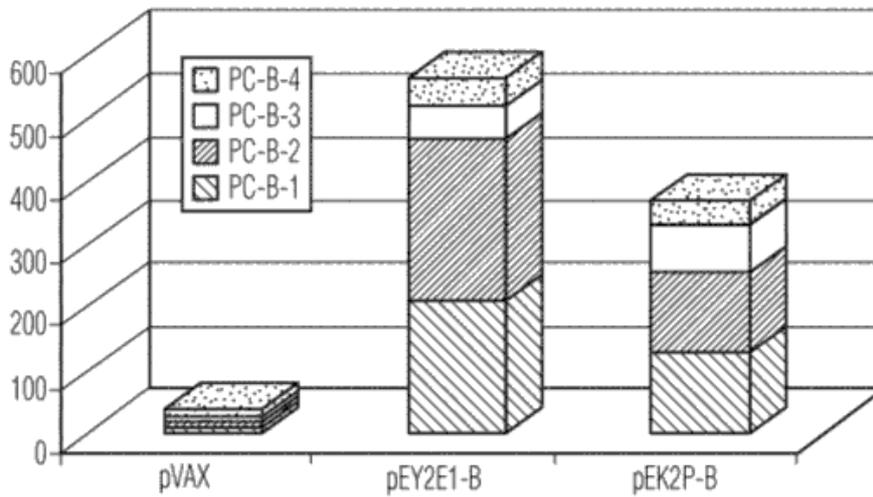


FIG. 12D

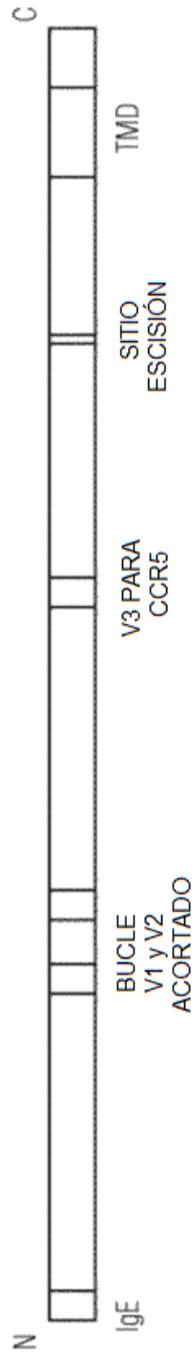


FIG. 13

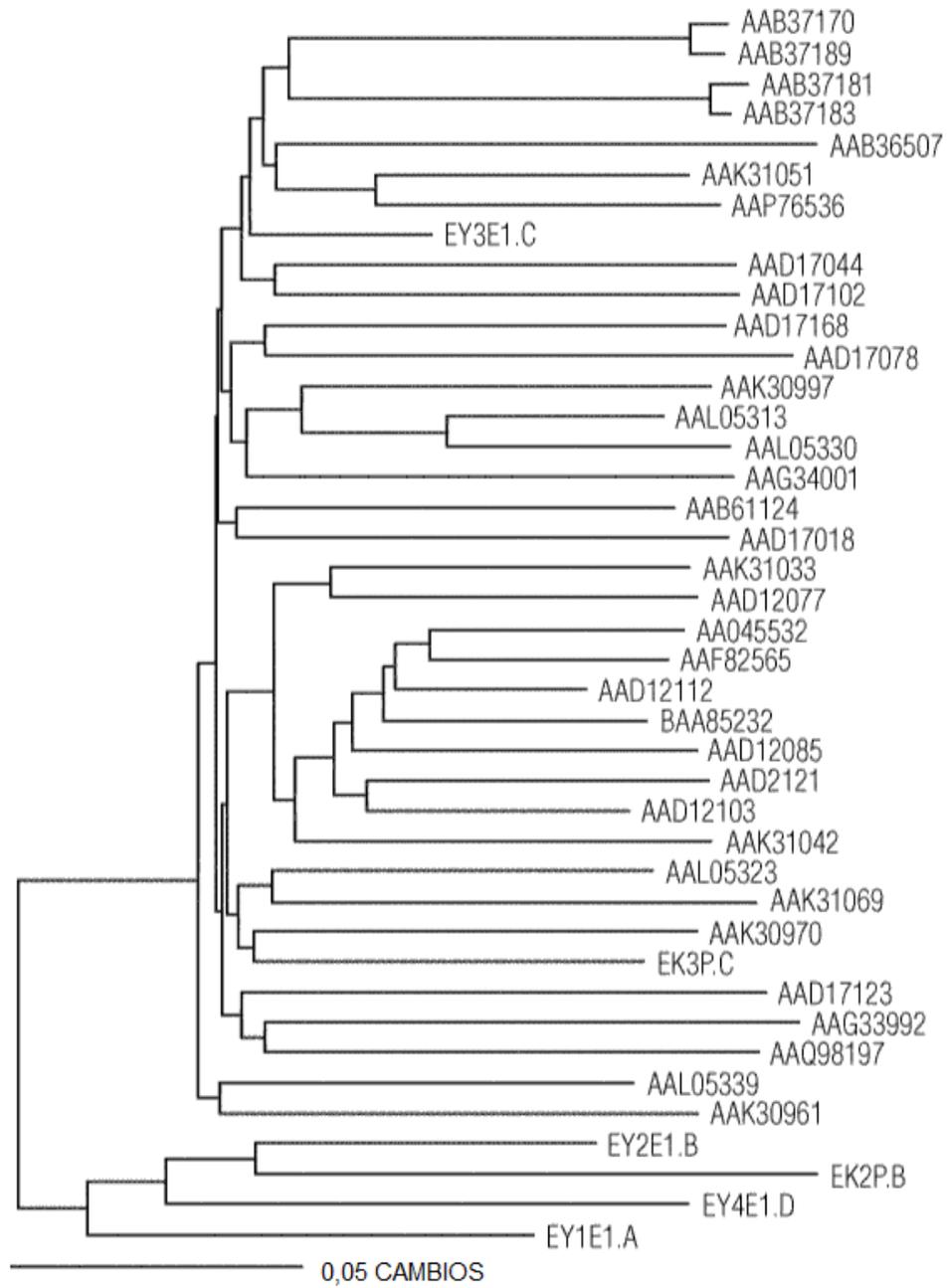


FIG. 14

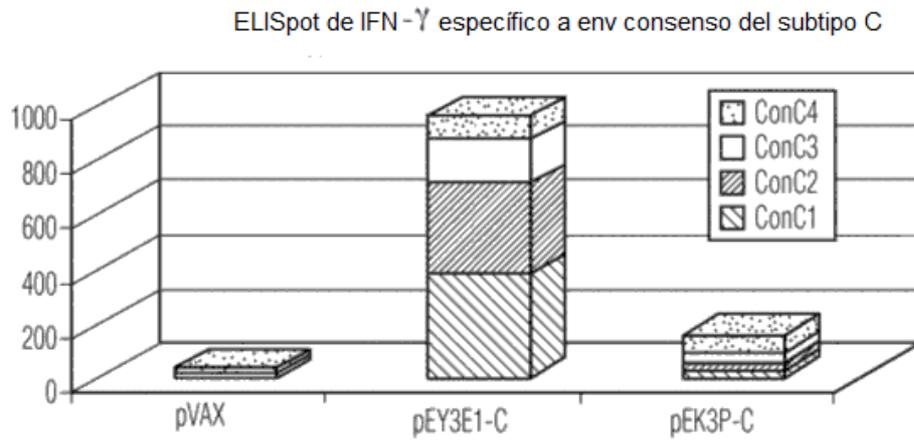


FIG. 15A

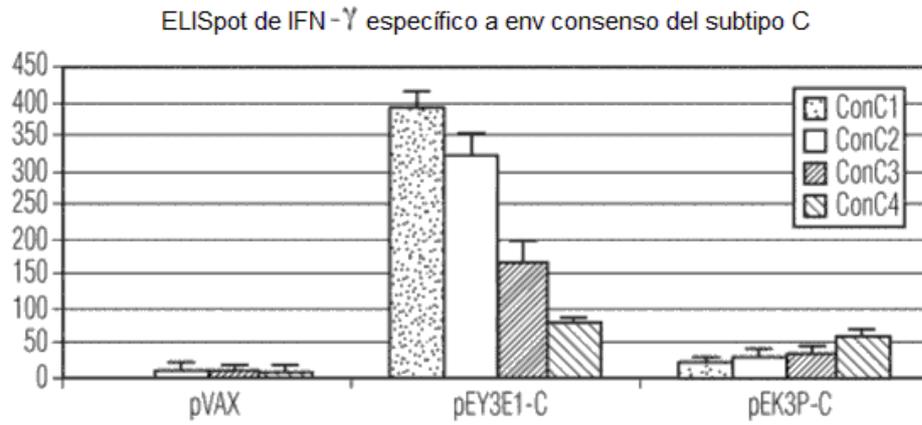


FIG. 15B

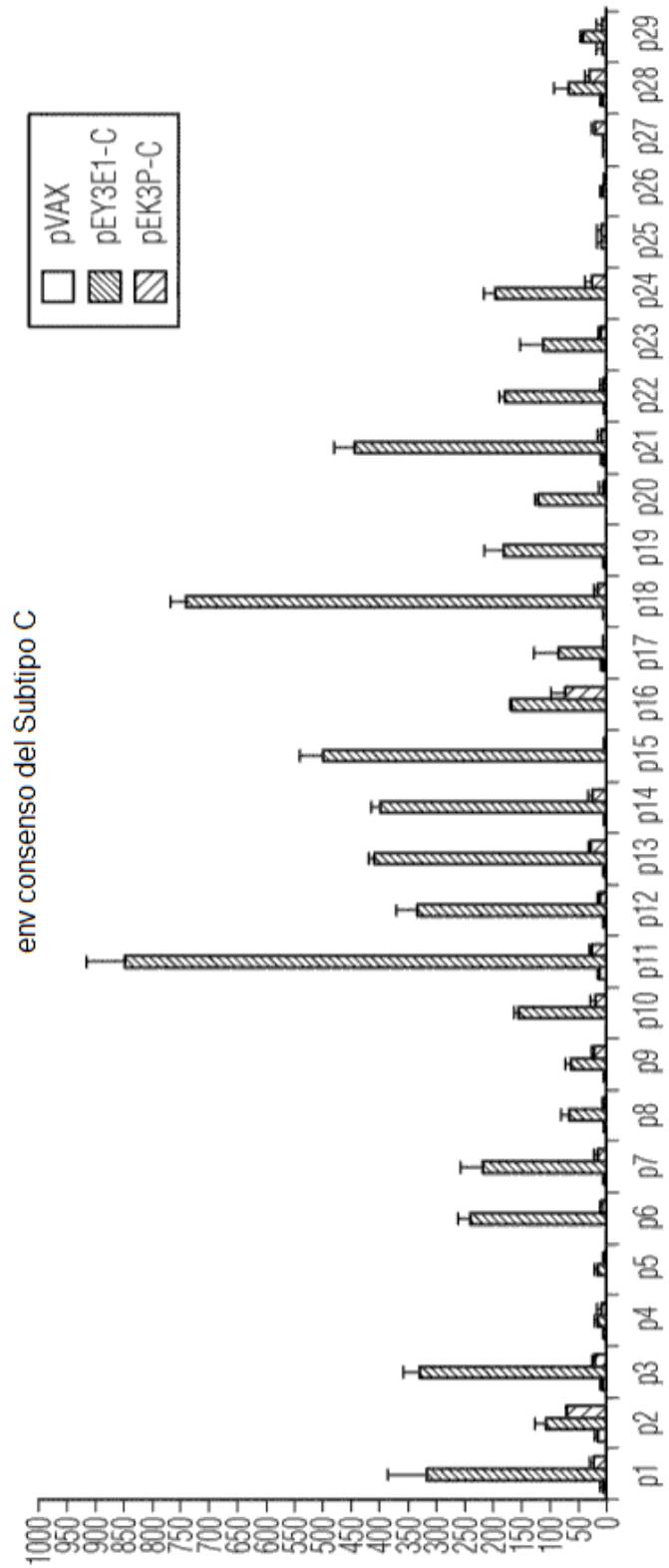


FIG. 16

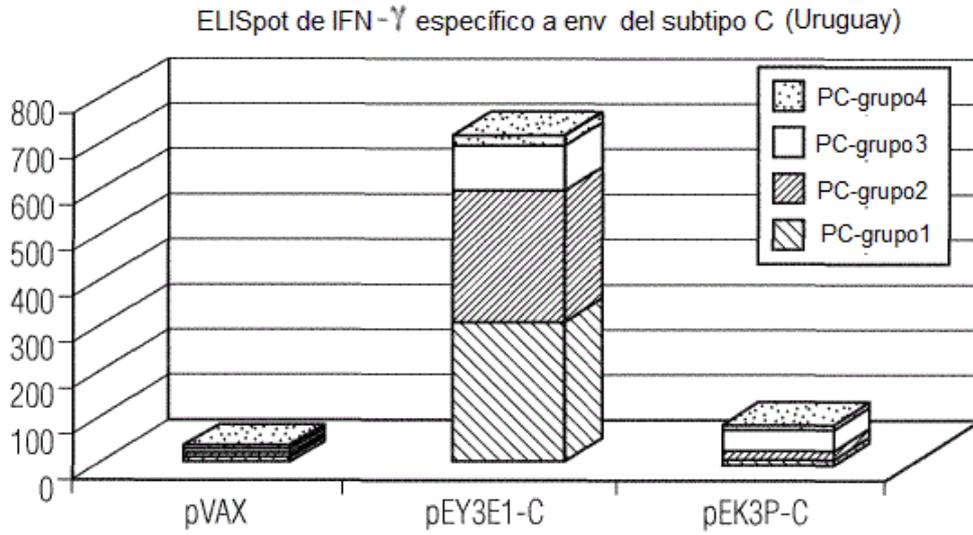


FIG. 17A

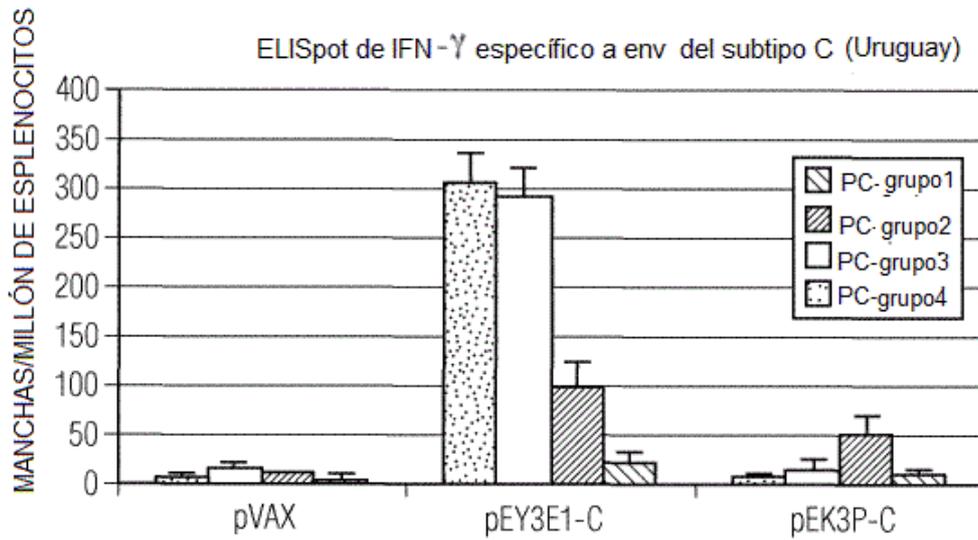


FIG. 17B

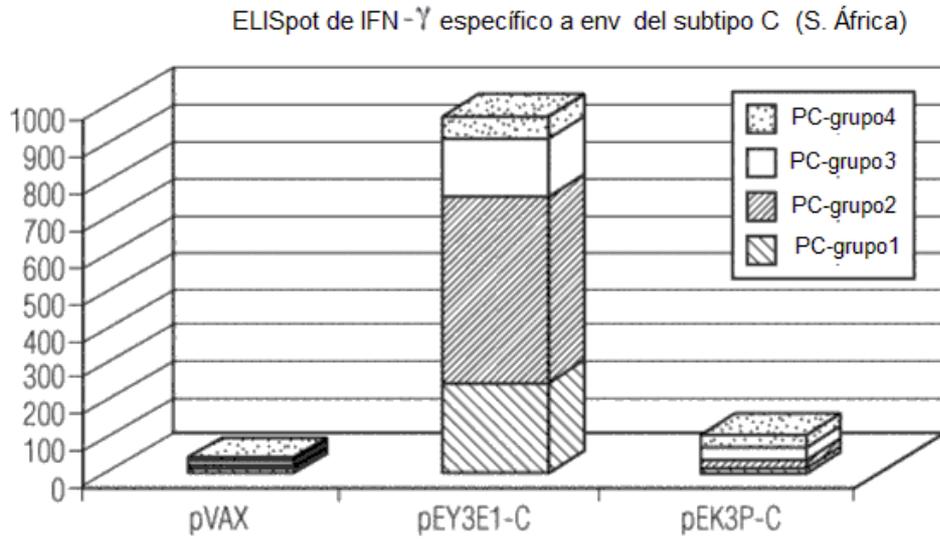


FIG. 17C

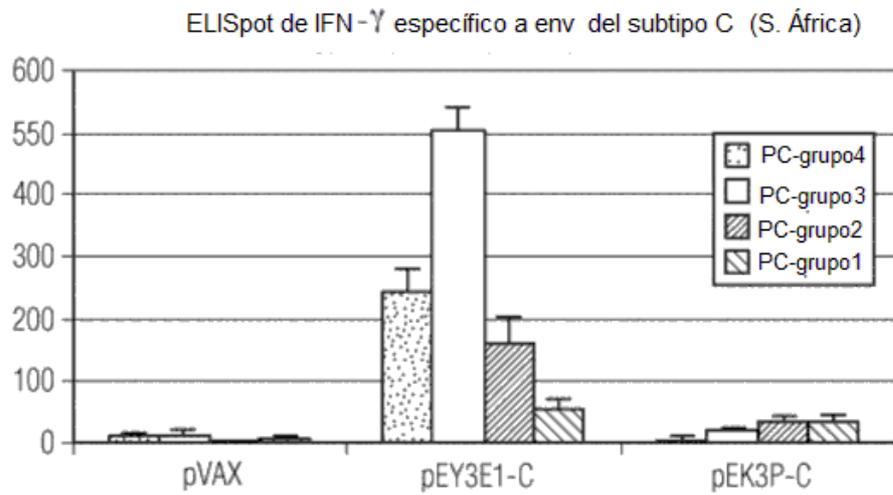


FIG. 17D

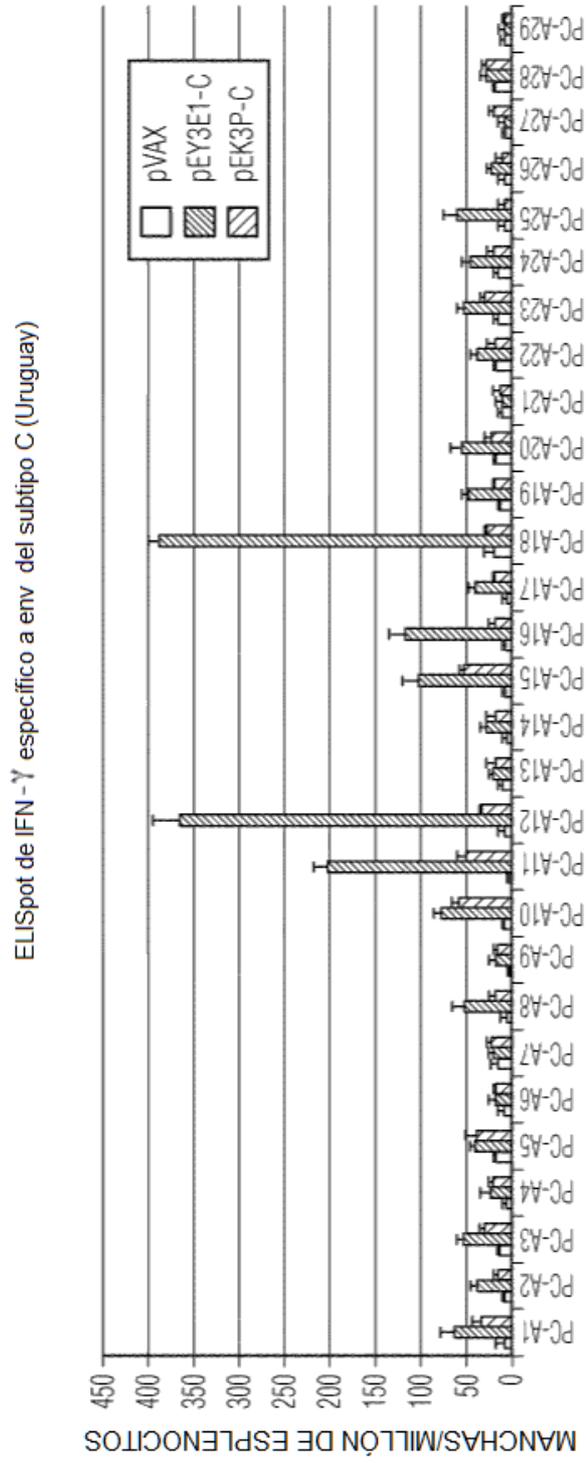


FIG. 18A

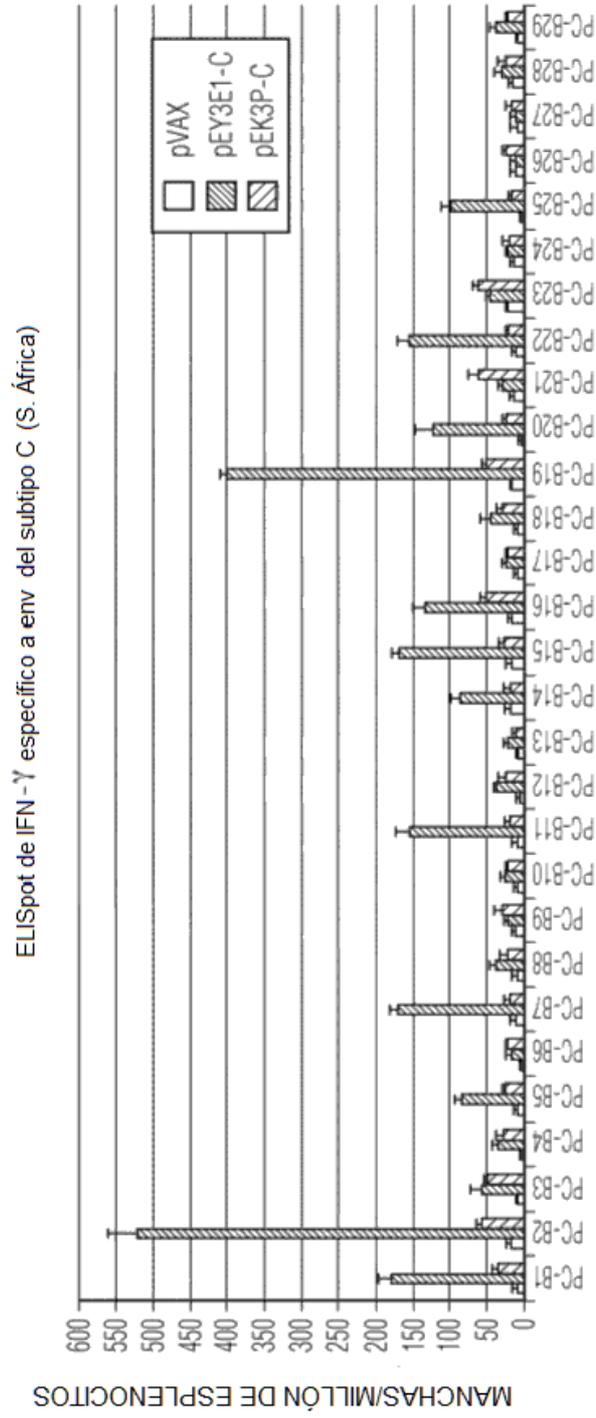


FIG. 18B

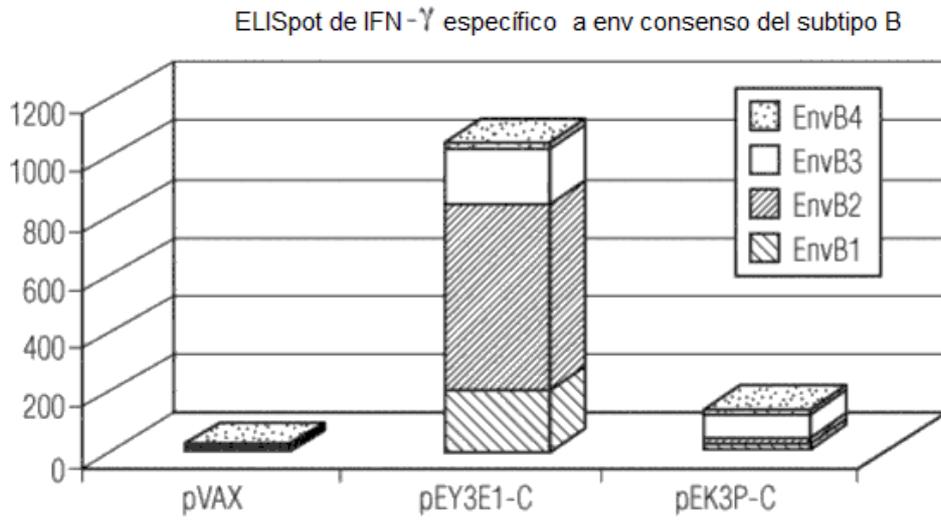


FIG. 19A

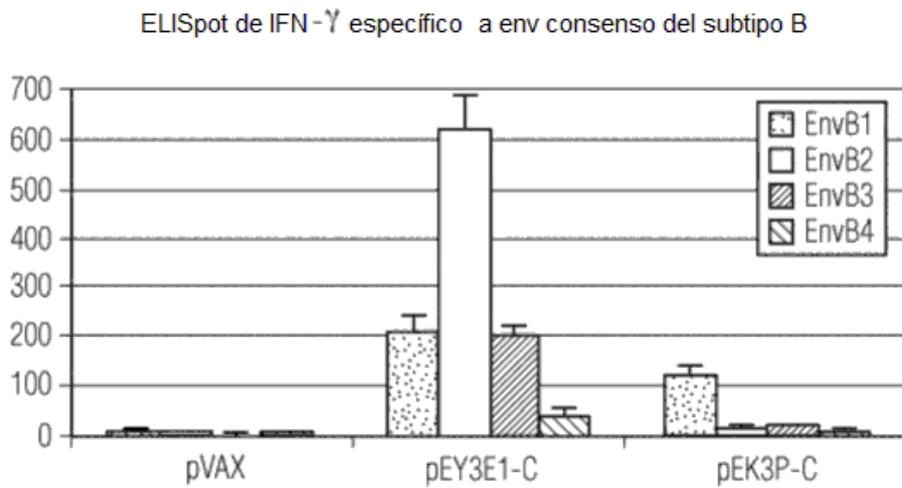


FIG. 19B

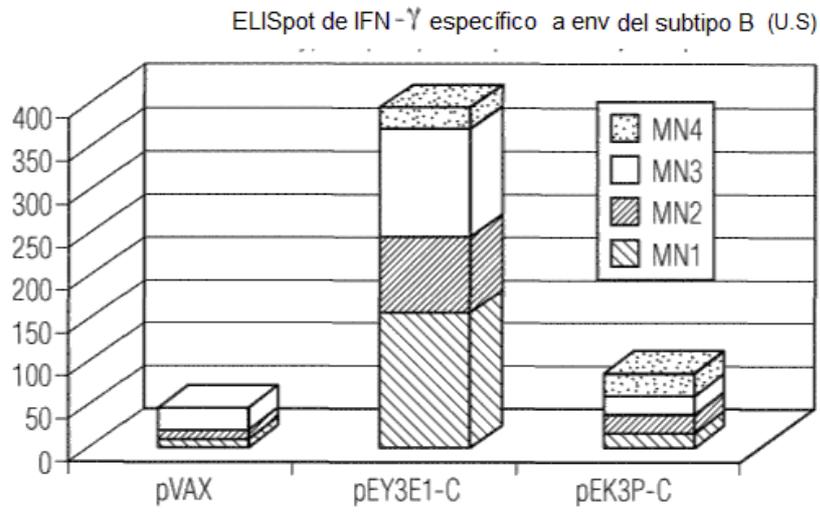


FIG. 19C

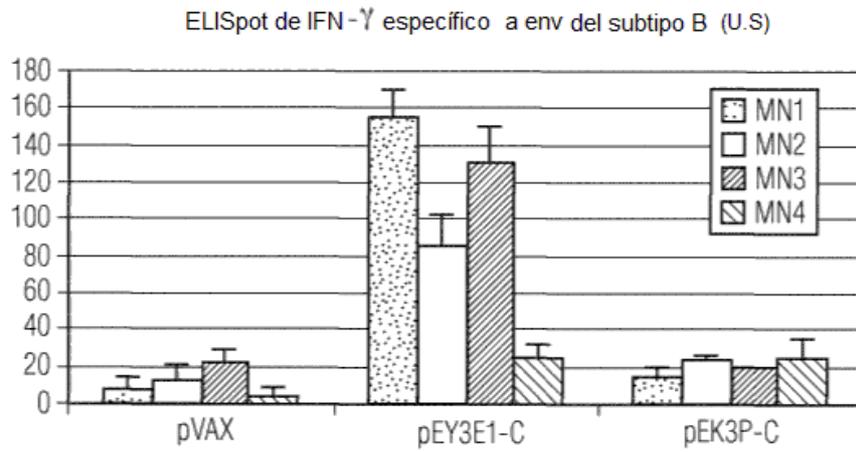


FIG. 19D

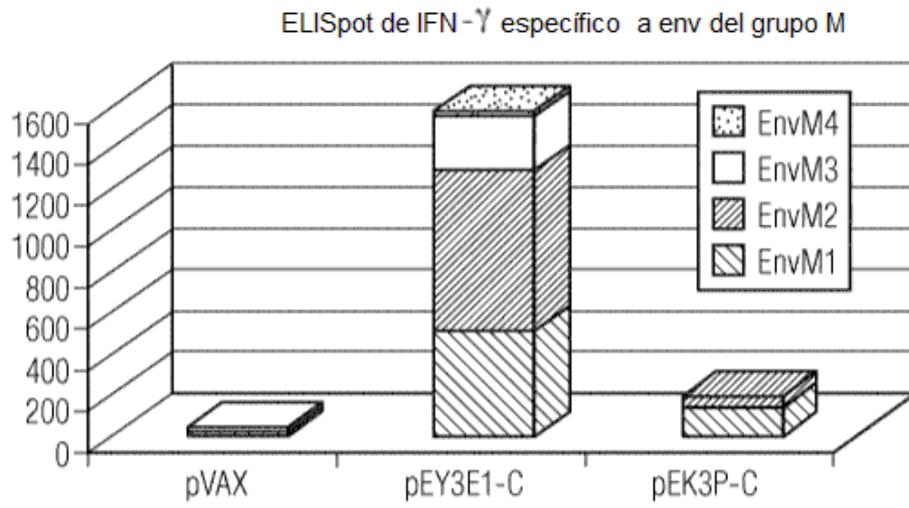


FIG. 19E

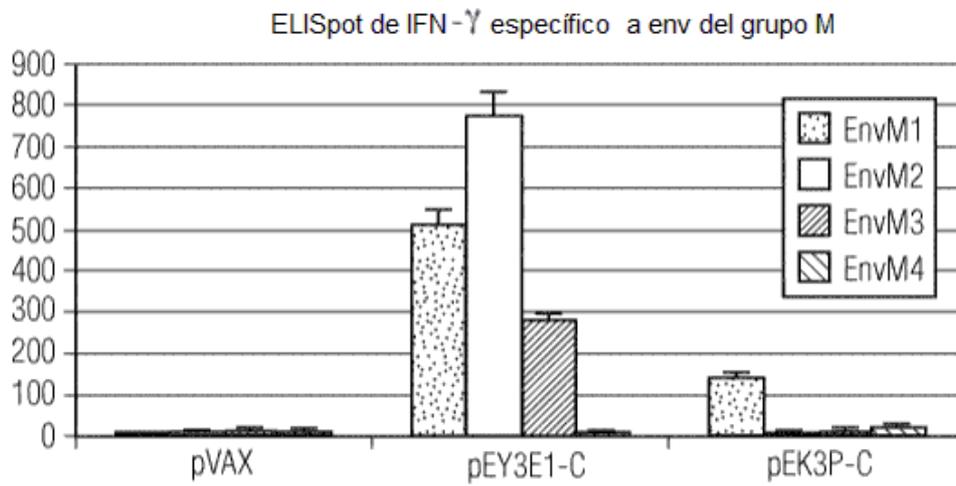


FIG. 19F

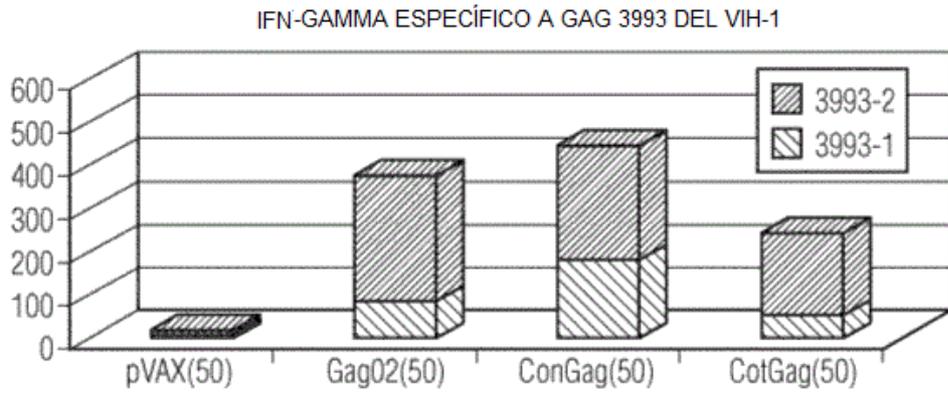


FIG. 20A

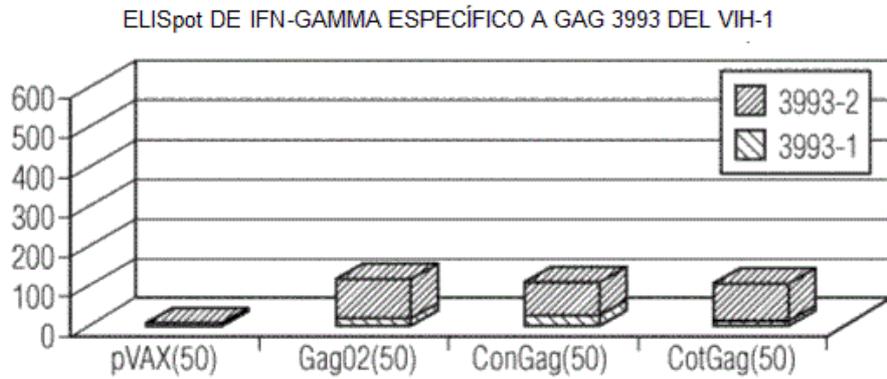


FIG. 20B

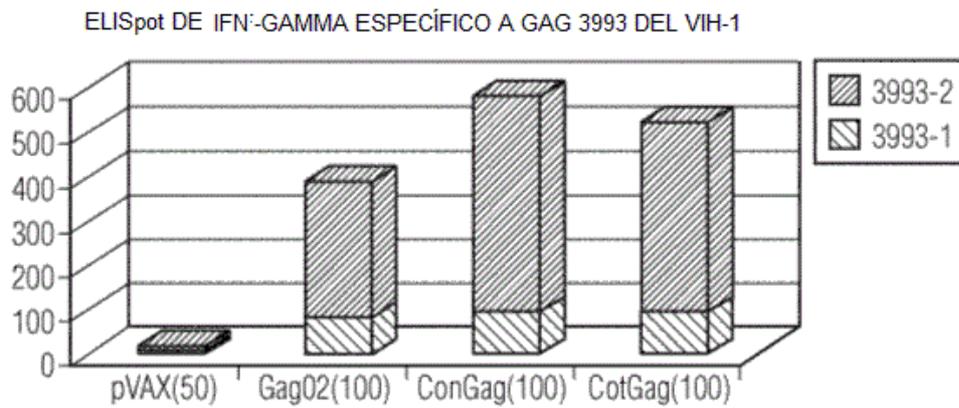


FIG. 20C

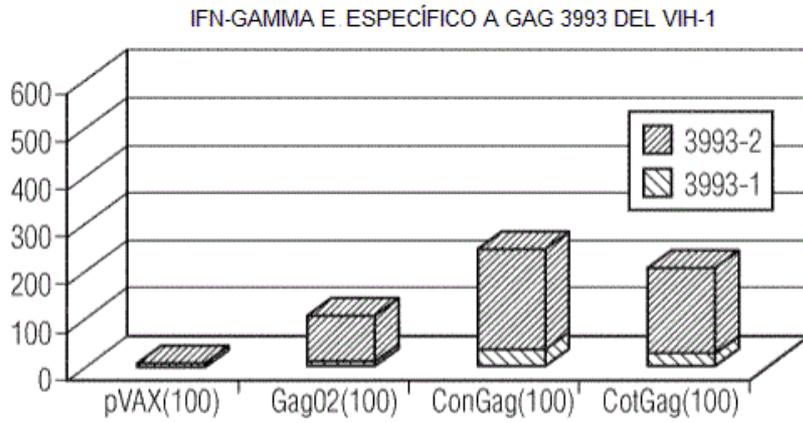


FIG. 20D

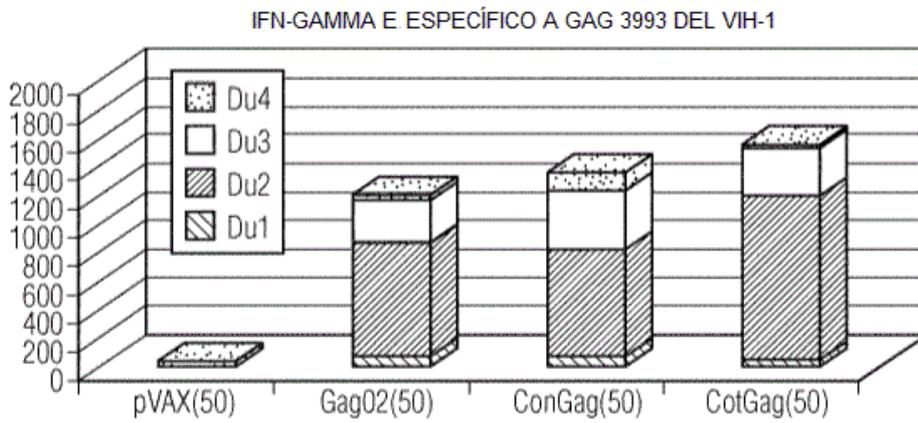


FIG. 20E

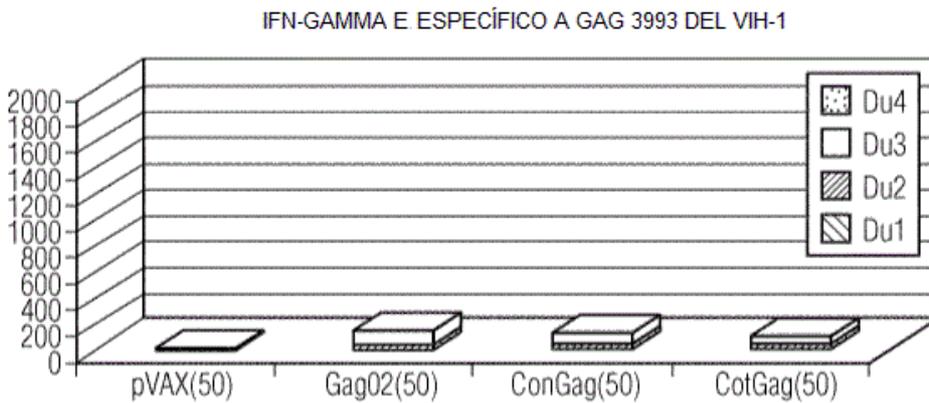


FIG. 20F

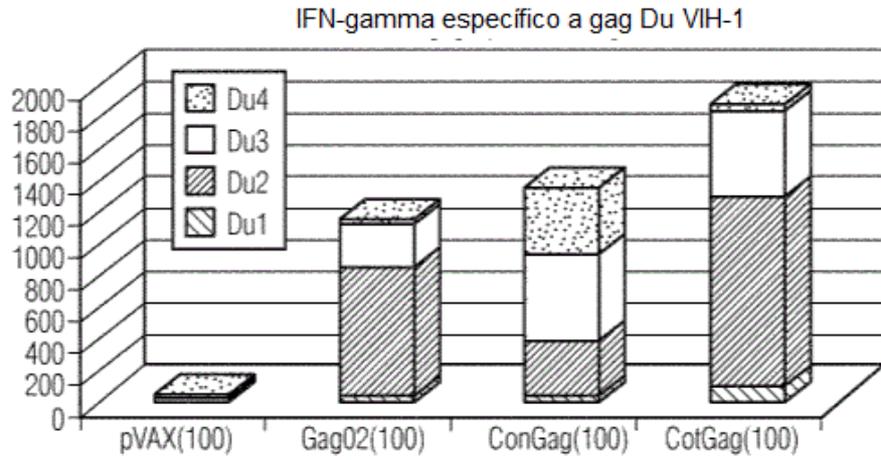


FIG. 20G

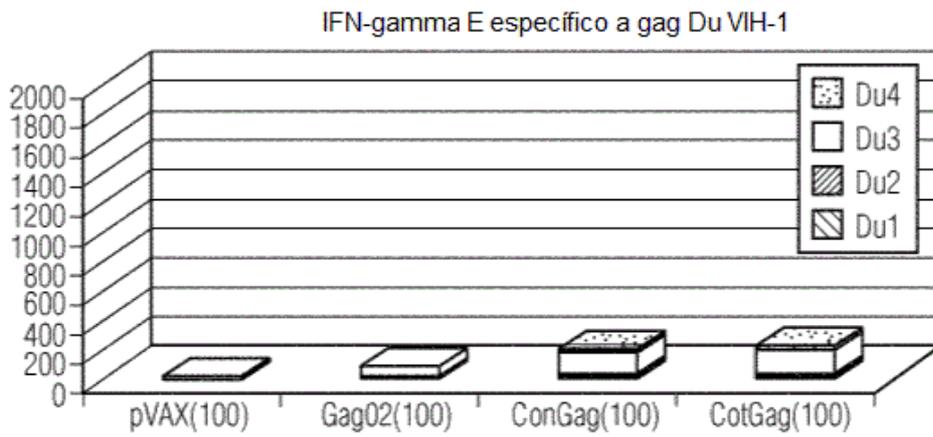


FIG. 20H

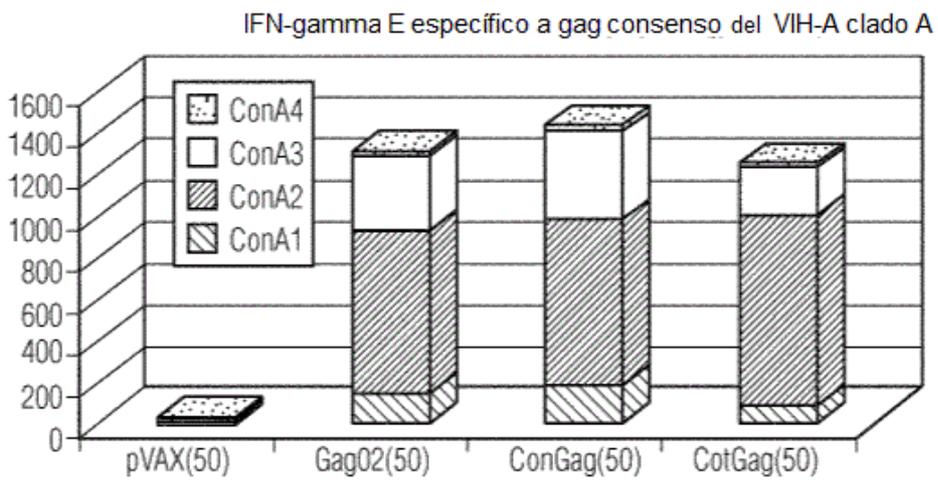


FIG. 20I

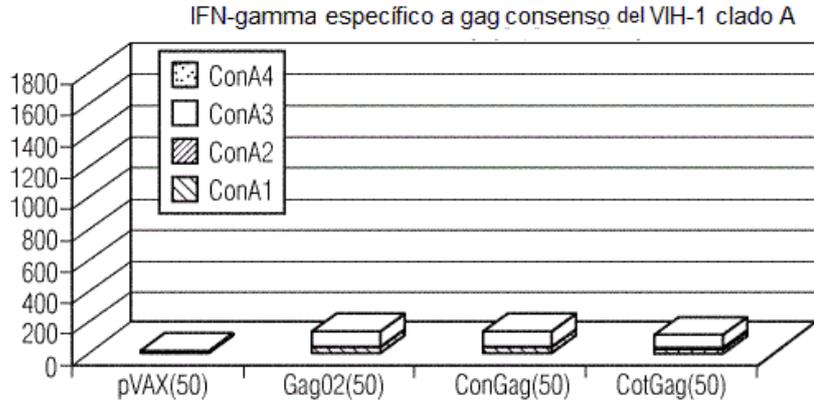


FIG. 20J

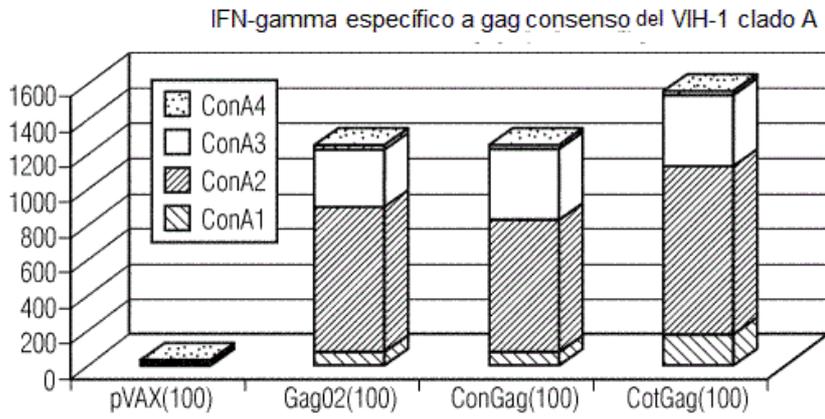


FIG. 20K

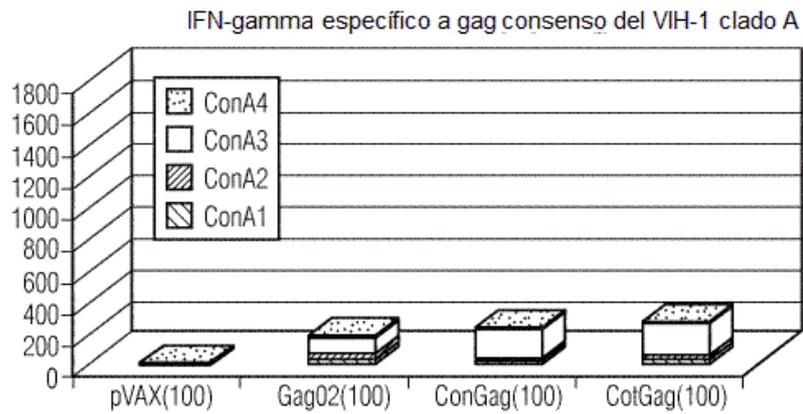


FIG. 20L

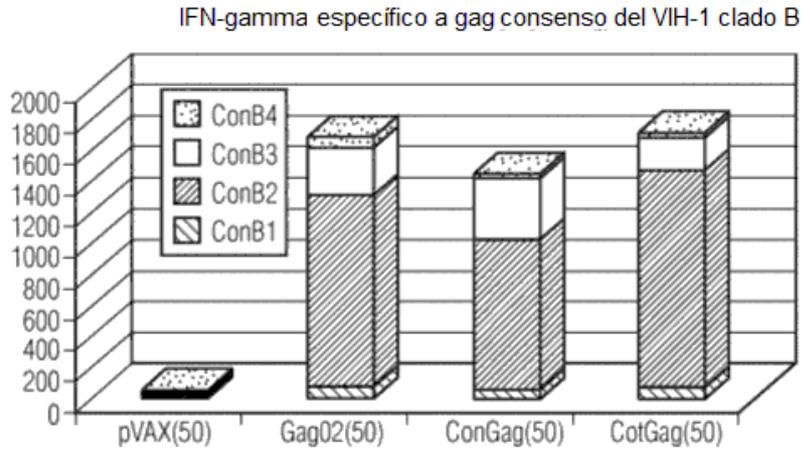


FIG. 20M

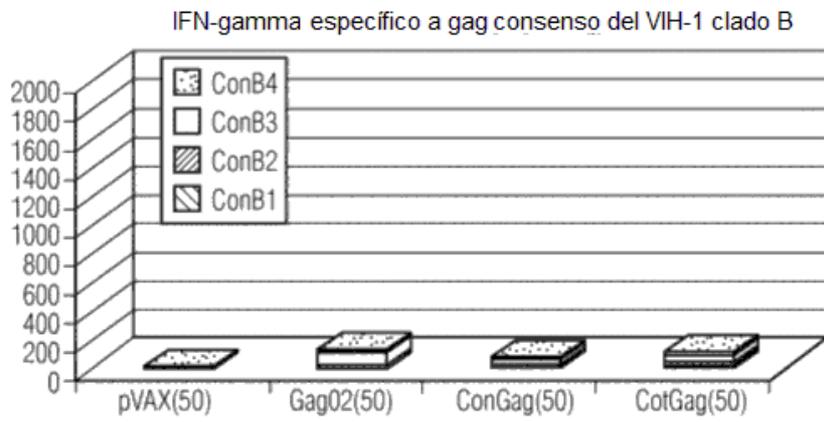


FIG. 20N

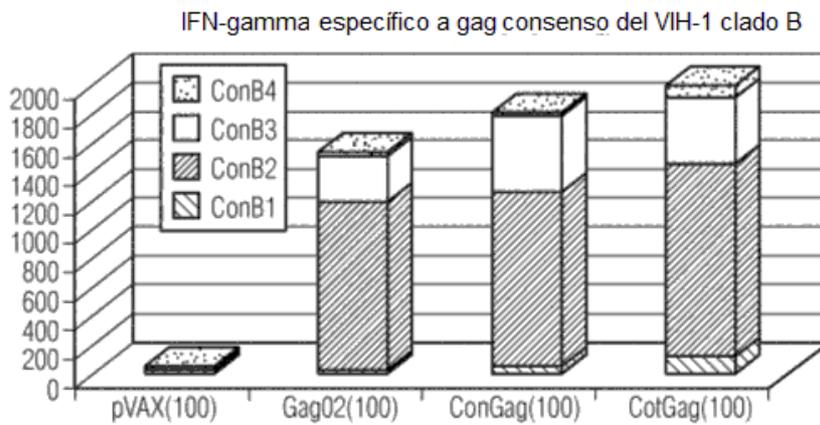


FIG. 20O

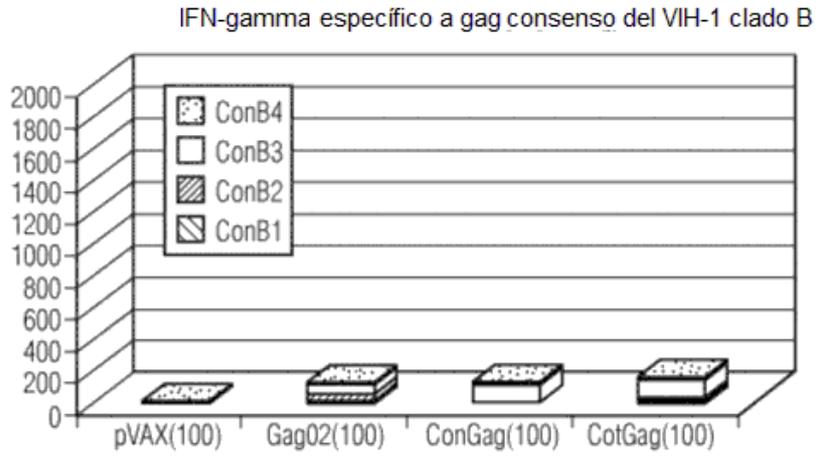


FIG. 20P

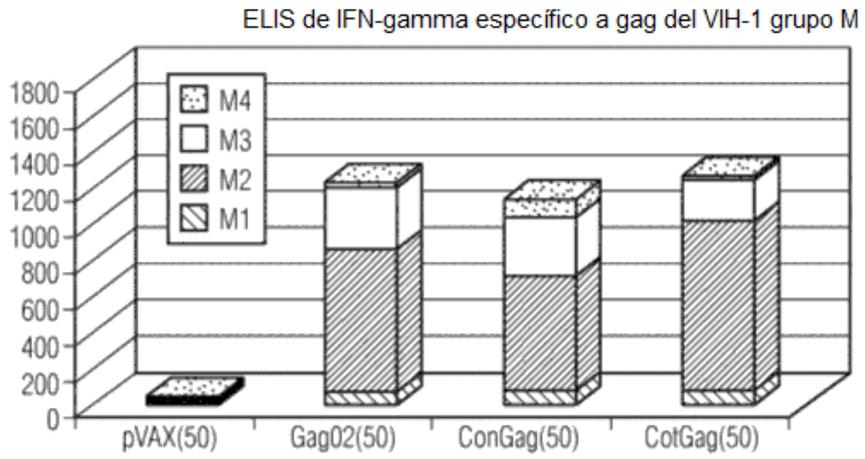


FIG. 20Q

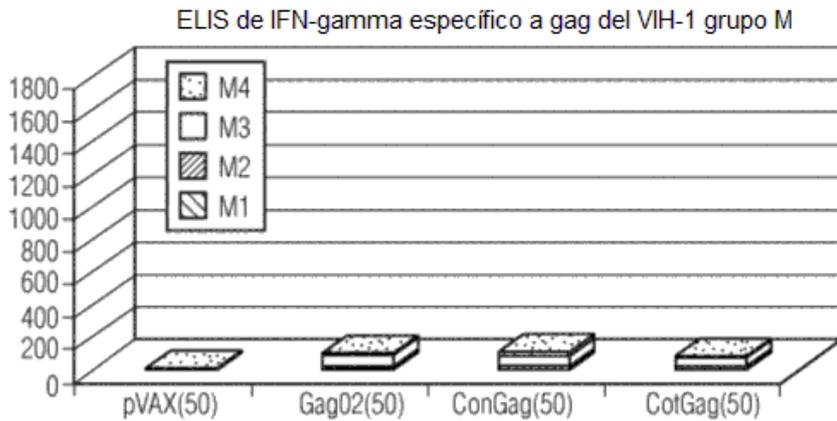


FIG. 20R

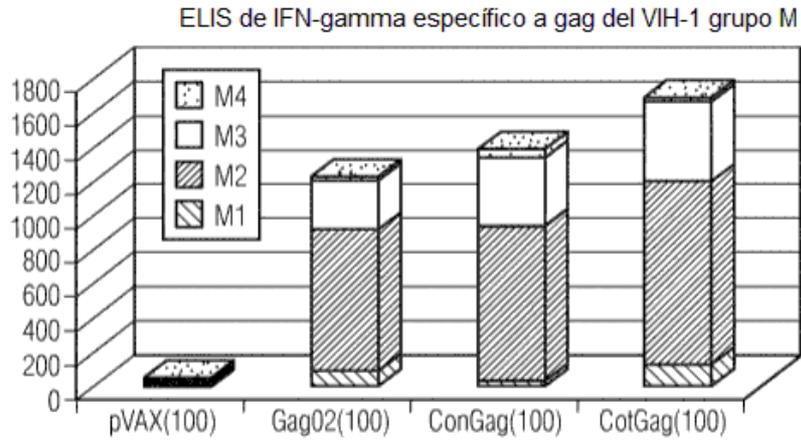


FIG. 20S

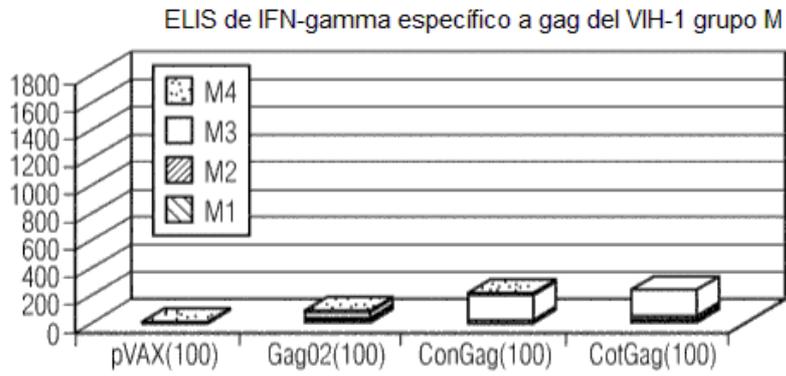


FIG. 20T

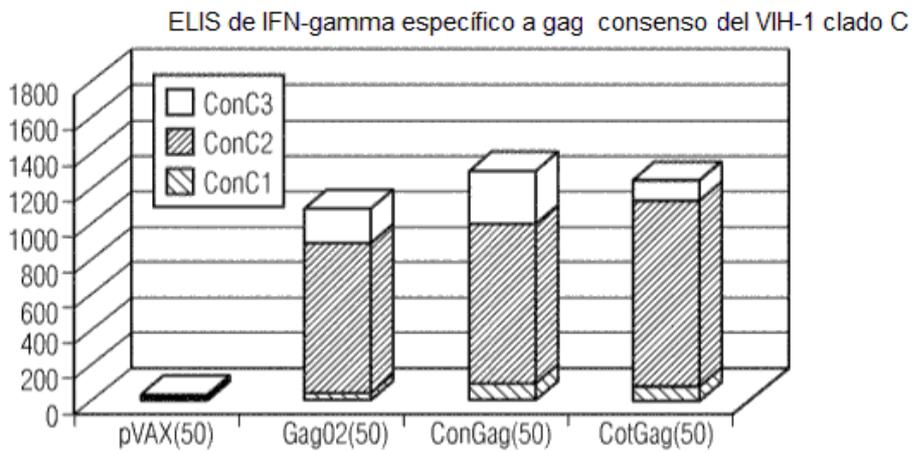


FIG. 20U

ELIS de IFN-gamma específico a gag consenso del VIH-1 clado C

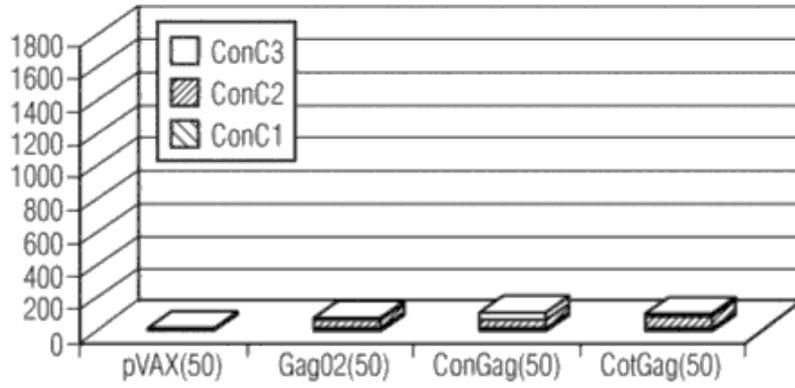


FIG. 20V

ELIS de IFN-gamma específico a gag consenso del VIH-1 clado C

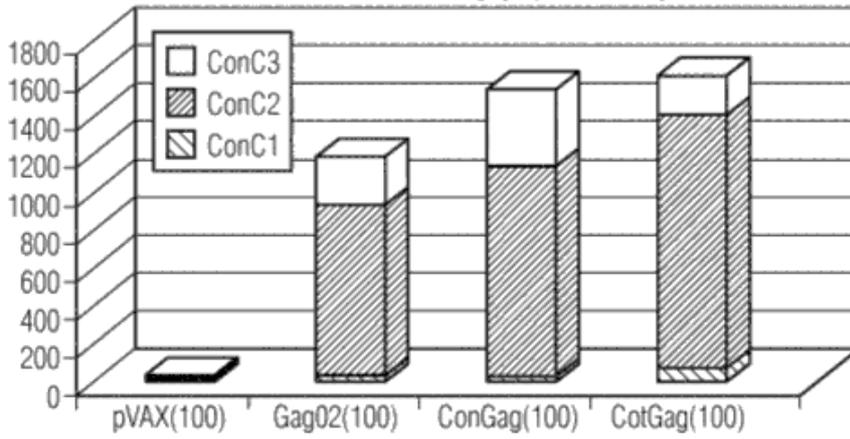


FIG. 20W

ELIS de IFN-gamma específico a gag consenso del VIH-1 clado C

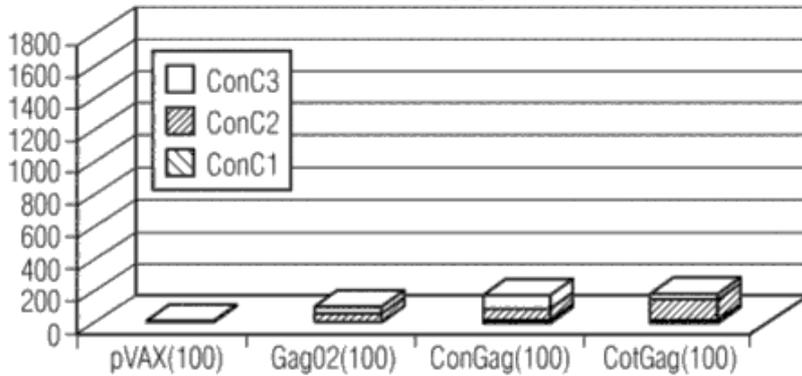


FIG. 20X

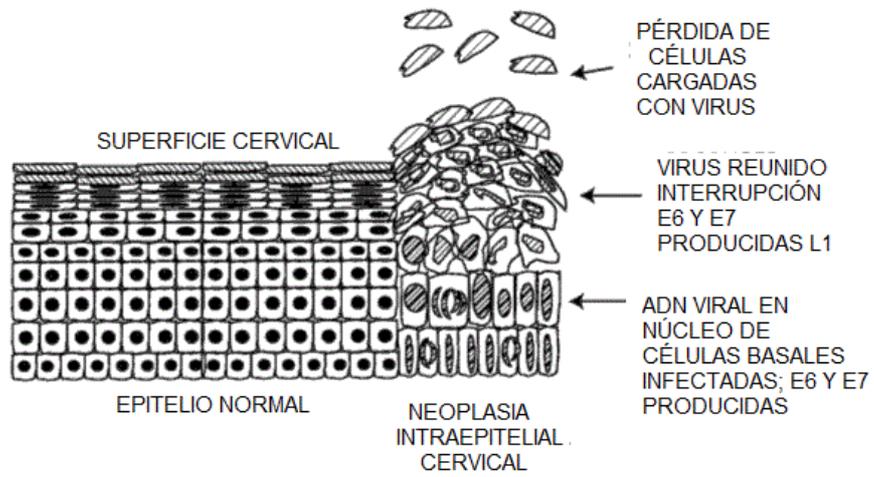


FIG. 21

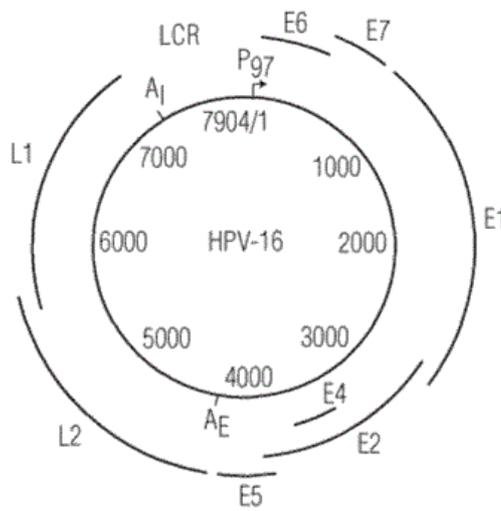


FIG. 22

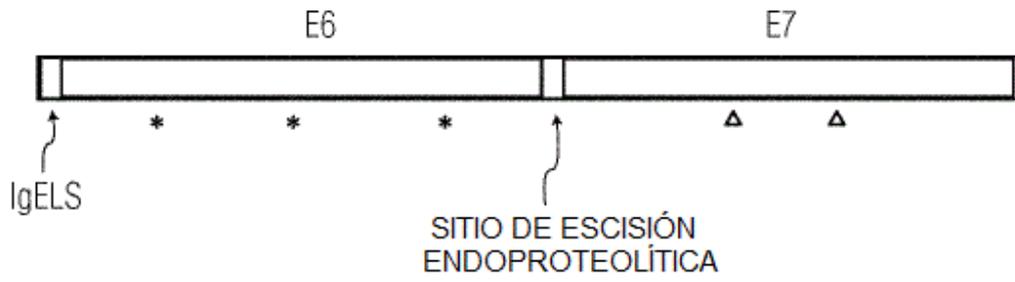


FIG. 23

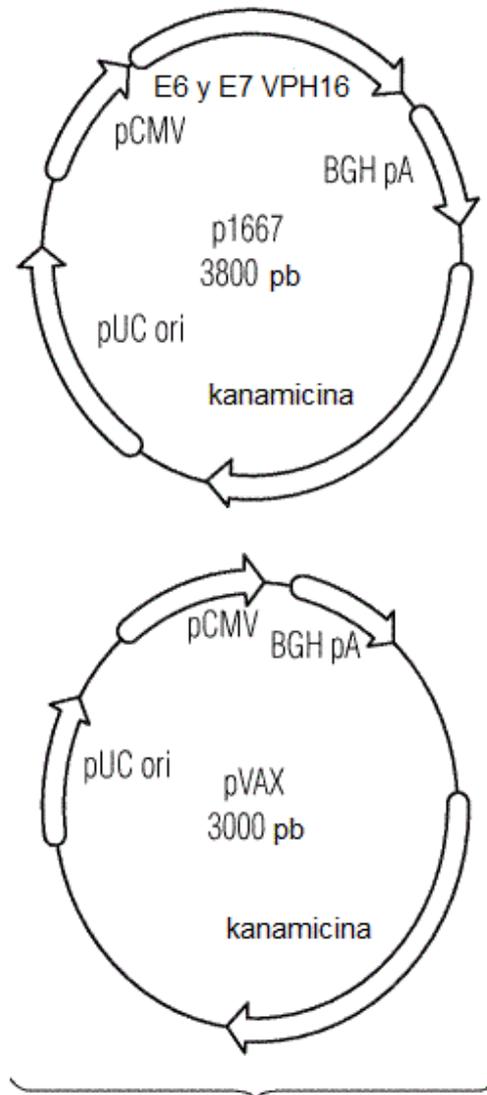


FIG. 24

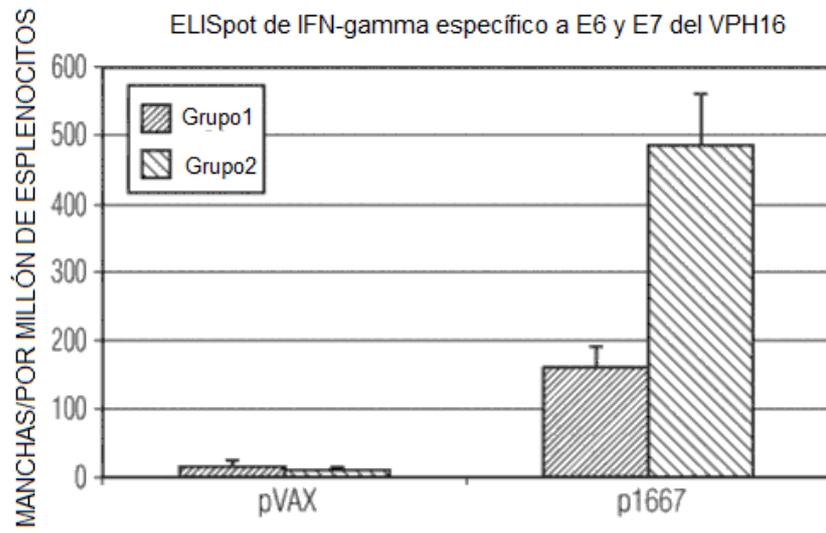


FIG. 25A

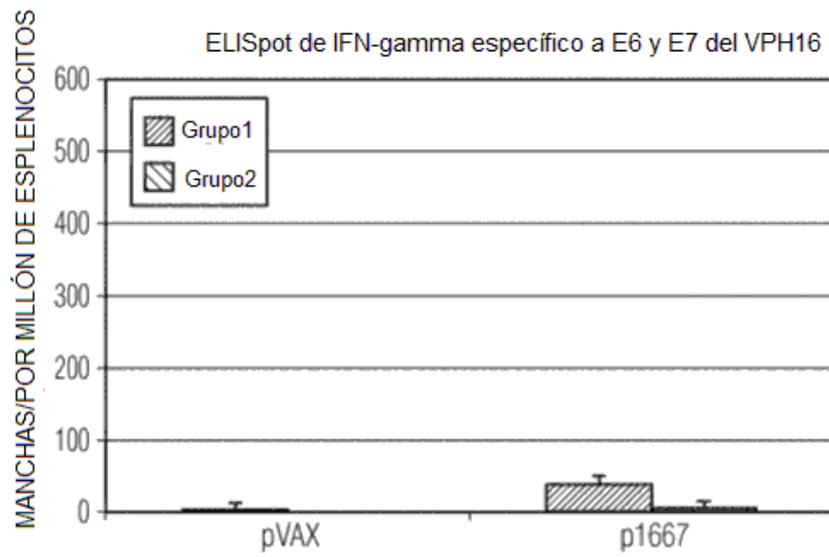


FIG. 25B

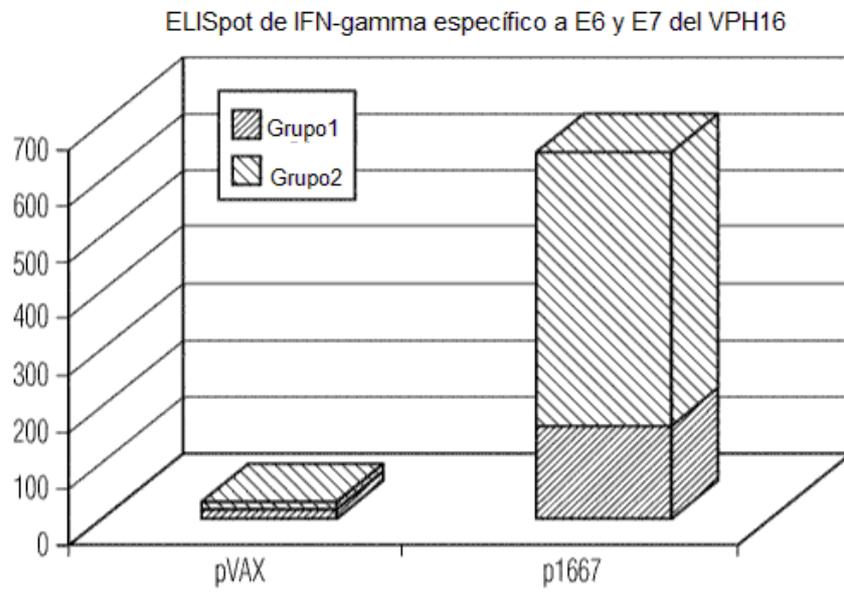


FIG. 25C

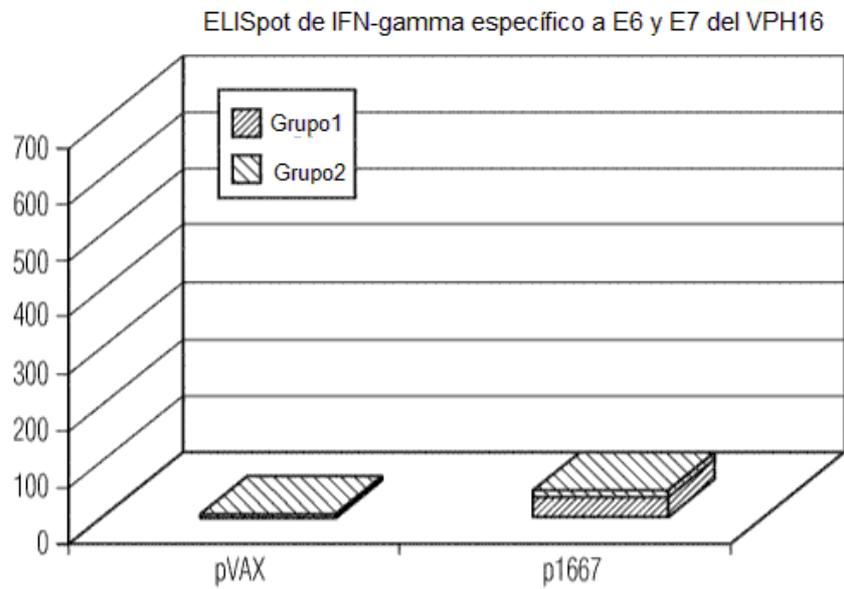


FIG. 25D

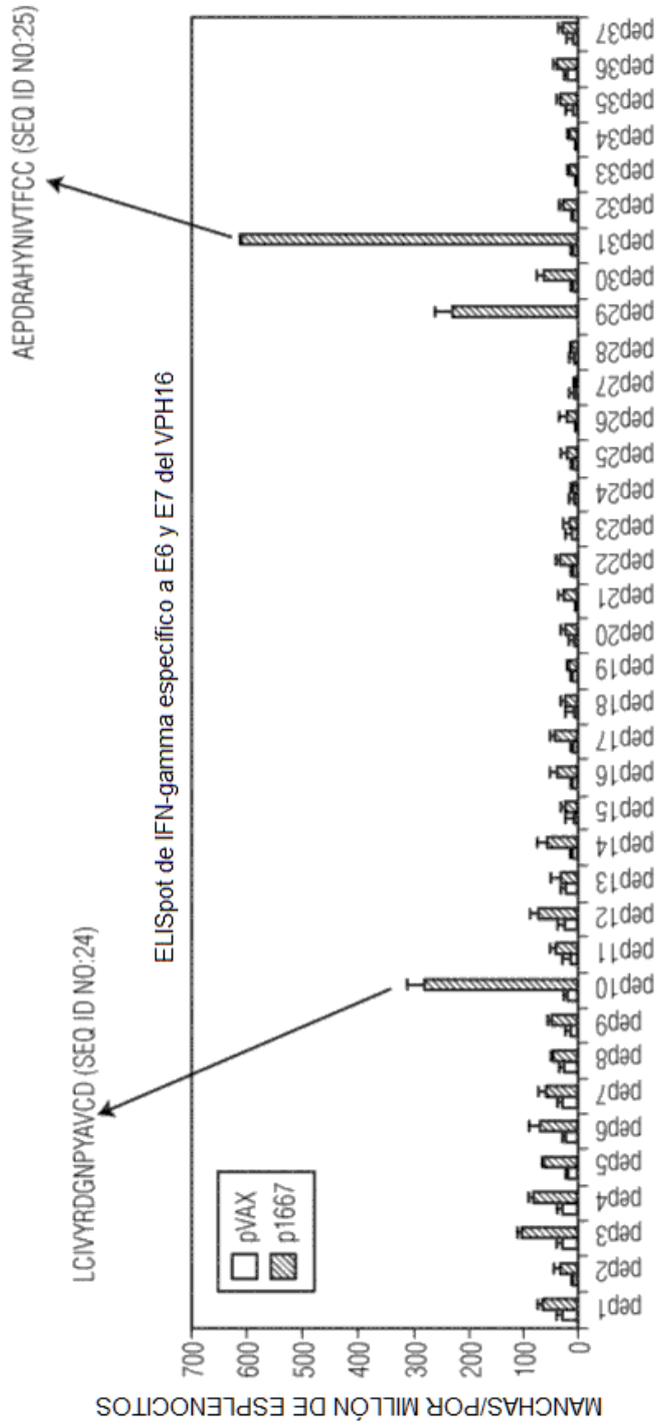


FIG. 26

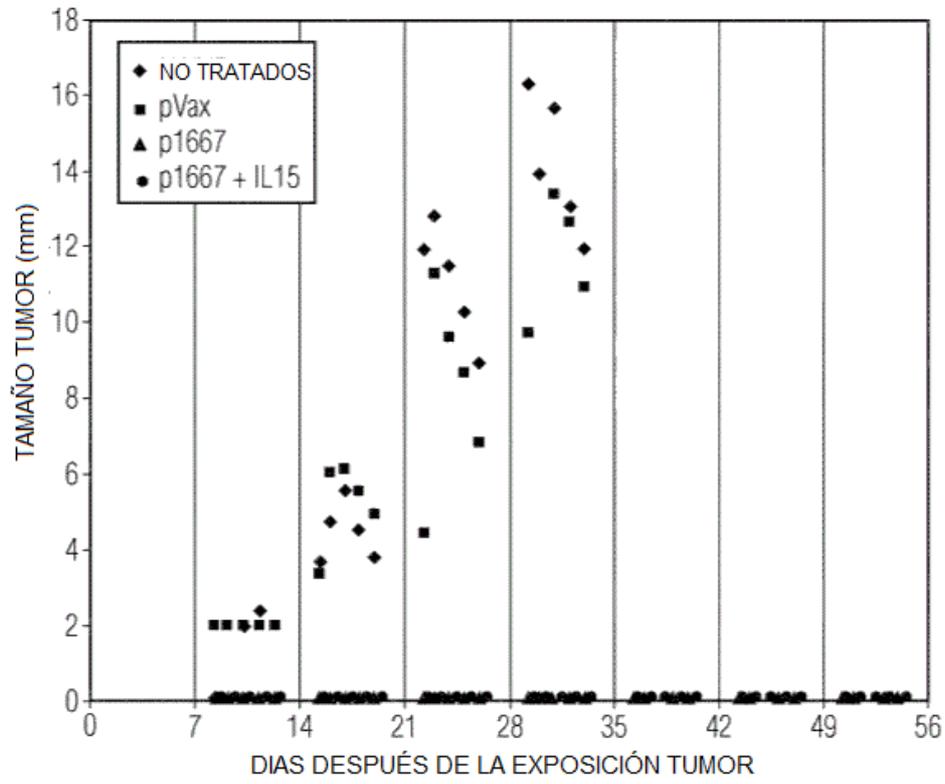


FIG. 27

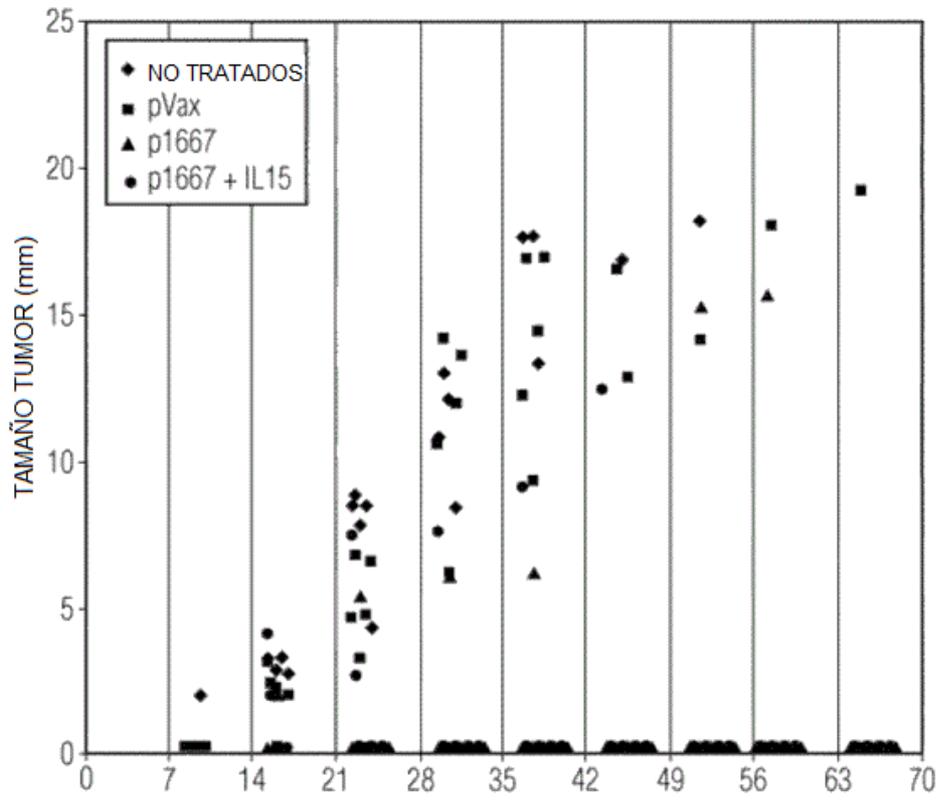


FIG. 28

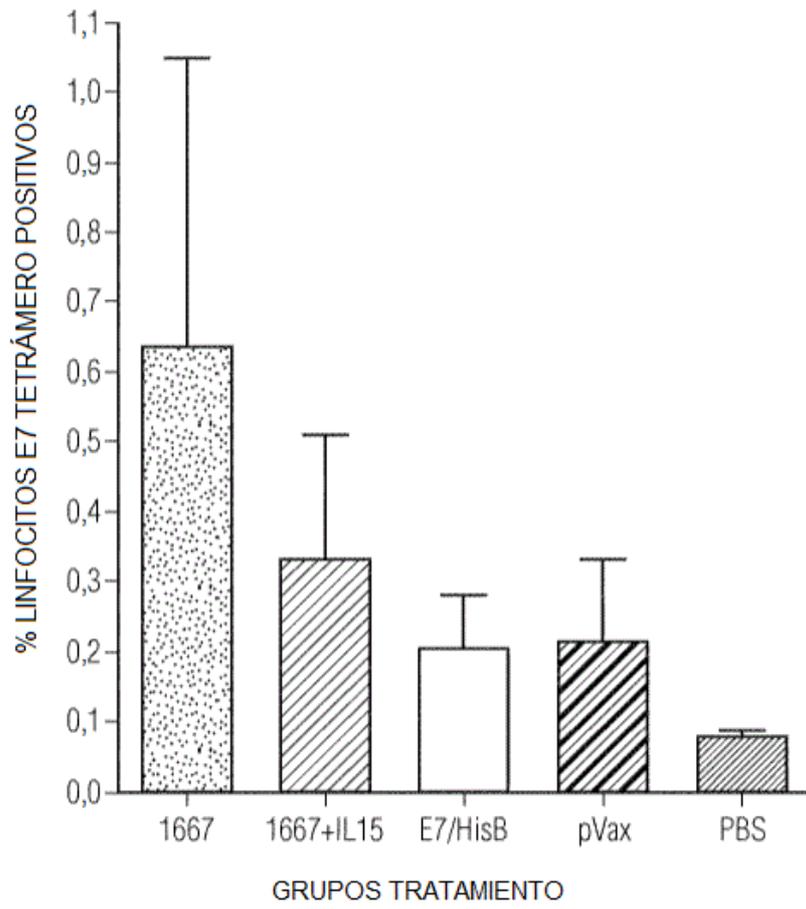


FIG. 29

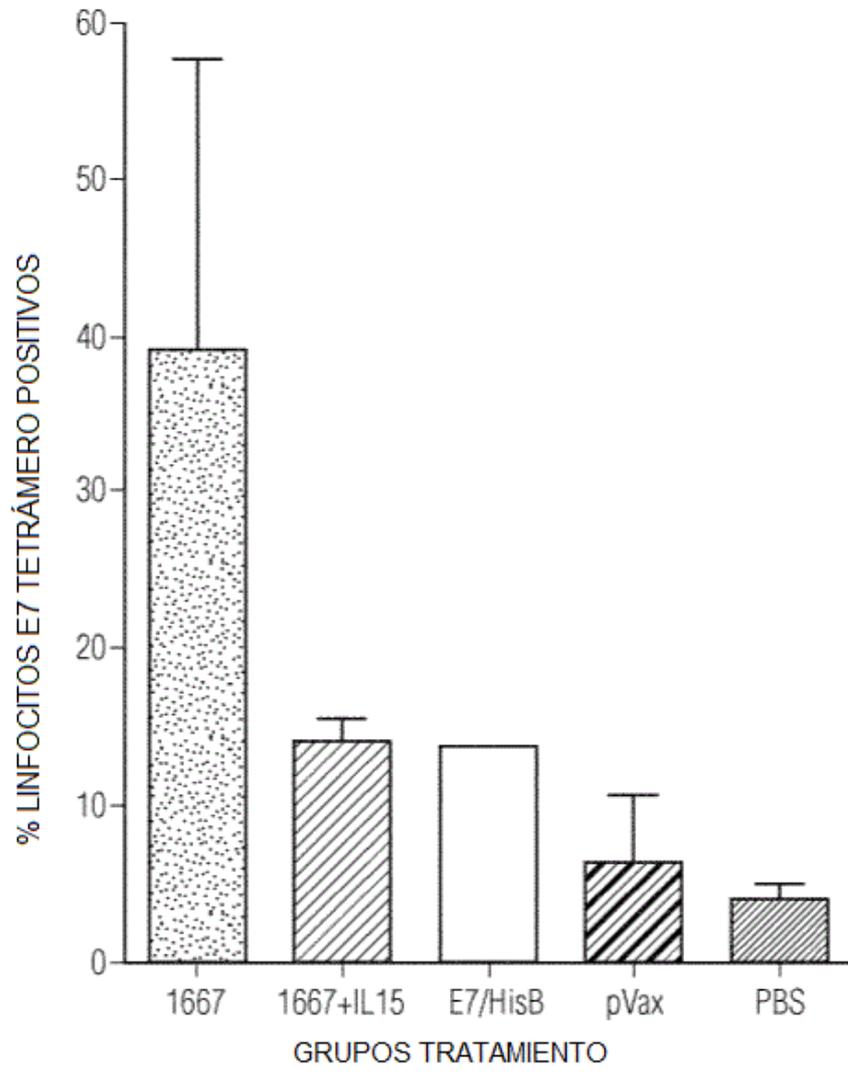


FIG. 30

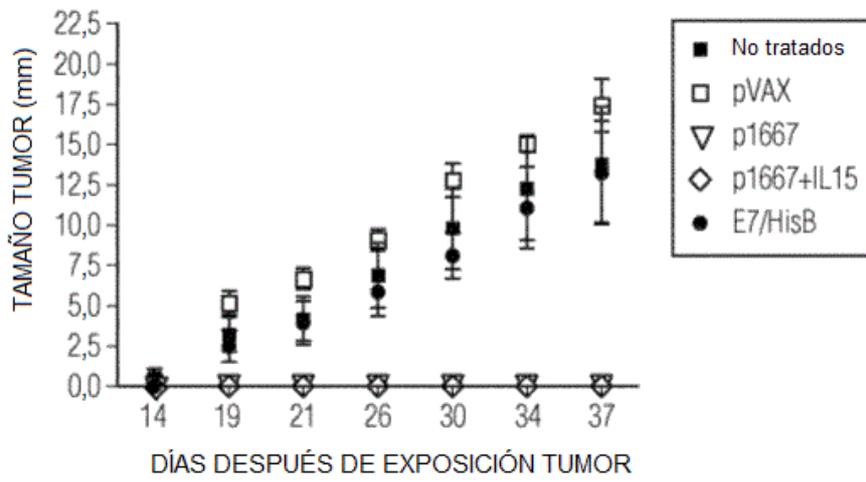


FIG. 31

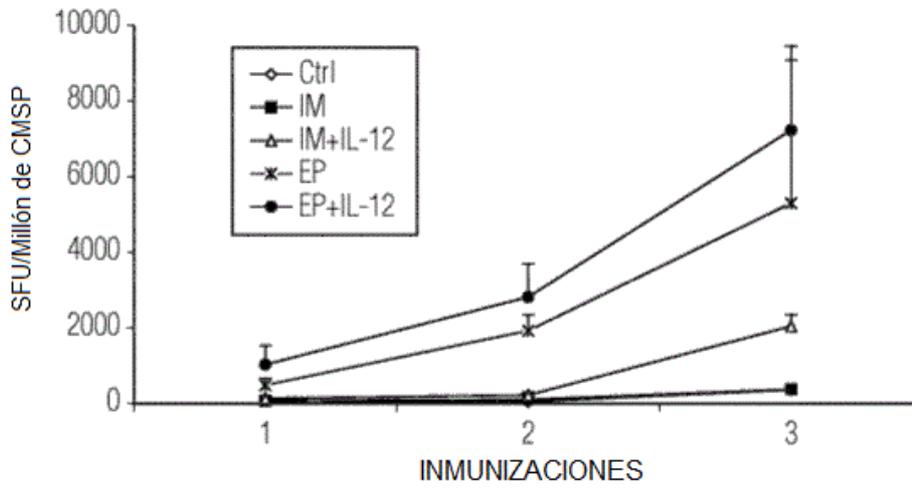


FIG. 32

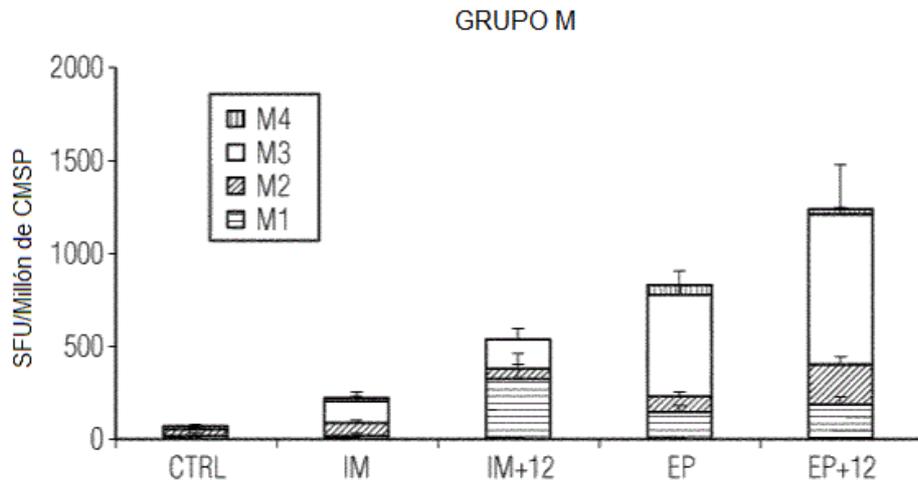


FIG. 33

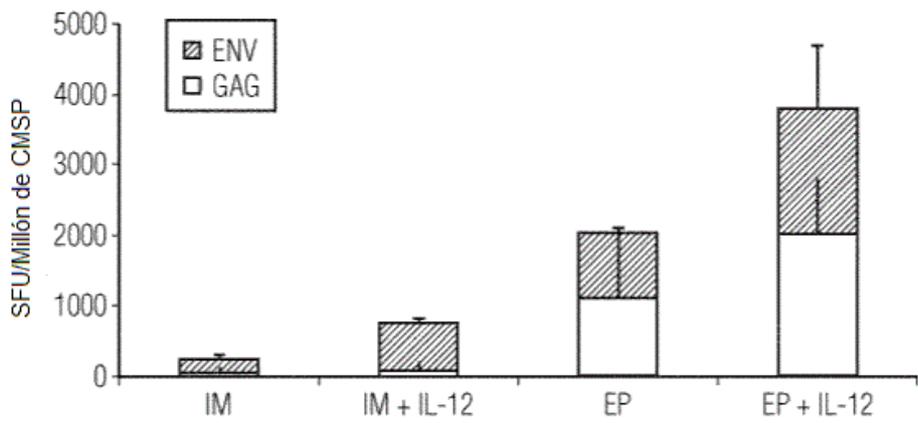


FIG. 34