

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 899**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2013 PCT/US2013/028932**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013 WO13131099**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2013 E 13710247 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2820035**

54 Título: **Método para modificar la jerarquía de inmunodominio de gag del VIH mediante una vacuna de ADN que expresa regiones conservadas**

30 Prioridad:

**02.03.2012 US 201261606265 P**

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

**05.07.2019**

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (50.0%)  
National Institutes Of Health, Office of Technology Transfer, 6011 Executive Boulevard, Suite 325  
Rockville, MD 20852-3804, US y  
UNIVERSITY OF WASHINGTON THROUGH ITS CENTER FOR COMMERCIALIZATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PAVLAKIS, GEORGE;  
FELBER, BARBARA y  
MULLINS, JAMES**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 718 899 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

Método para modificar la jerarquía de inmunodominio de gag del VIH mediante una vacuna de ADN que expresa regiones conservadas

5

## REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º 61/606.265 presentada el 2 de marzo de 2012.

10

**Antecedentes de la invención**

Las cepas del VIH-1 son muy variables y esta diversidad representa un gran desafío para el diseño de vacunas. Una vacuna candidata proporcionaría protección contra la mayoría de los clados del VIH. Para abordar este problema, se están explorando estrategias para maximizar la fuerza y la amplitud inmunológica, incluyendo estrategias que utilizan secuencias consenso, de centro de árbol o ancestrales, cepas múltiples o inmunógenos mosaico, inmunógenos que consisten en epítomos conocidos de las bases de datos y moléculas quiméricas que expresan una selección de los epítomos más conservados de diferentes clados del VIH [1-17, 56, 96]. Se ha desarrollado un régimen de sensibilización/refuerzo que utiliza vectores adenovíricos que expresan la proteína p55Gag del VIH-1 que proporciona protección cruzada a clados [107].

15

20

Además de la diversidad de secuencias, la presencia de posibles epítomos inmunodominantes proporciona otro obstáculo en el desarrollo de vacunas eficaces contra el VIH. La acumulación de pruebas indica que existen epítomos inmunodominantes, y que pueden constituir un impedimento para la producción de vacunas universales eficaces contra el VIH [18-31], ya que los epítomos subdominantes, dentro de las proteínas del VIH, se han asociado generalmente al control virológico [19, 22]. El uso de cualquier gen que, como inmunógeno, englobe una proteína completa, contiene regiones variables y conservadas. Dado que las secuencias variables pueden mutar para escapar de las respuestas inmunitarias al mismo tiempo que conservan la función, y que pueden contener epítomos de linfocitos T inmunodominantes, argumentamos que los segmentos variables deben excluirse del diseño [32]. Por tanto, nuestra estrategia de vacuna está enfocada en la inducción de respuestas inmunitarias en segmentos proteómicos casi invariables, muchos de los cuales deberían ser esenciales para la función del virus y para la prevención de respuestas contra segmentos variables y epítomos "señuelo" posiblemente inmunodominantes [32-34].

25

30

La estrategia del elemento conservado está respaldada por las siguientes observaciones: (i) las proteínas víricas recuperan los estados de los aminoácidos (AA) ancestrales cuando se transfieren a un nuevo hospedador [35], y en ausencia de las respuestas inmunitarias específicas encontradas en el hospedador anterior, pueden recuperar un estado más adecuado [36-38]; (ii) los cambios en los AA conservados de las proteínas víricas pueden destruir o debilitar significativamente el VIH, lo que indica un papel crítico en la biología de los virus [39-42]; (iii) las respuestas de CTL contra proteínas víricas específicas (por ejemplo, Gag) se asocian con el control relativo de la viremia [43-50], y en el caso de individuos controladores y no progresores a largo plazo, se han identificado CTL de alta avidéz que se dirigen a regiones conservadas [34, 51]; (iv) la inmunodominancia de algunos epítomos puede oscurecer o impedir la reactividad contra otros, epítomos posiblemente protectores [52]; (v) algunos segmentos de AA en las proteínas víricas se conservan a lo largo de un subtipo determinado del VIH-1, de todo el grupo M y, en algunos casos, en el VIH-2 y el VIS (virus de la inmunodeficiencia en simios) [32,53]. En conjunto, estas cuestiones predijeron que una vacuna contra el VIH que no contiene epítomos variables, y por tanto, carece de epítomos señuelo posiblemente inmunodominantes, pero en su lugar consiste en elementos proteómicos estrictamente conservados, se ajusta mejor para inducir respuestas inmunitarias capaces de impedir la adquisición o la propagación del virus [32,53]. Los elementos conservados utilizados en nuestro trabajo difieren de los utilizados por otros [11,12,16,17,54-56] que se seleccionaron utilizando diferentes criterios, ya que nos hemos centrado tanto en la conservación como en las asociaciones de secuencias particulares con control inmunológico.

35

40

45

50

Se han realizado trabajos anteriores que utilizaban Gag como una vacuna prototipo, debido a que se descubrió que las respuestas de linfocitos T específicas de Gag se correlacionaban con el control de la viremia en individuos infectados con los clados B y C [43,48-50]. En la p24<sup>gag</sup> del VIH-1, se identificaron siete elementos muy conservados (CE, del inglés *conserved elements*) [32,34] (véase también la Fig. 1A). De hecho, un estudio transversal *ex vivo* mostró un amplio reconocimiento de varios CE en el contexto de una amplia diversidad de HLA e identificó respuestas de linfocitos T de alta avidéz funcional y amplia reactividad de variante [34], predominantemente en individuos controladores, lo que sugiere una asociación entre estas respuestas de linfocitos T y el control del VIH.

55

La presente invención aborda la necesidad de un protocolo mejorado para inducir una respuesta inmunitaria, proporcionando una táctica que se basa en emplear construcciones de ADN que codifican elementos conservados junto con construcciones que codifican la proteína de longitud sustancialmente completa de la que procede la vacuna del elemento conservado.

60

65

**Breve resumen de la invención**

Los regímenes inmunogénicos de la presente divulgación se centran en respuestas inmunitarias a segmentos proteómicos importantes para la función de una proteína, por ejemplo, una proteína vírica, tal como una proteína gag lentivírica, y excluye respuestas contra segmentos que absorben gran parte de la respuesta inmunitaria del hospedador, pero que pueden mutar para escapar de las respuestas inmunitarias al mismo tiempo que conserva la función (a menudo referido en la técnica como "señuelos inmunodominantes") (32). Una vacuna de elementos conservados (CEvac, del inglés *conserved element vaccine*), administrada de acuerdo con la presente divulgación, tiene las propiedades de una vacuna universal contra un virus, tal como un lentivirus, por ejemplo, el VIH, y es capaz de inducir respuestas inmunitarias contra la mayoría de las cepas circulantes o contra todas las cepas circulantes. En el presente documento se describe un método para generar una respuesta inmunitaria, en la que el método comprende administrar una vacuna de ADN de p24<sup>gag</sup> que expresa elementos conservados, por ejemplo, de 3 a 7 elementos conservados (CE), de p24<sup>gag</sup> del VIH-1 y excluye posibles regiones inmunodominantes o variables que actúan como posibles epítomos señuelo (32); seguido de la administración de una vacuna de ADN que codifica una gag de longitud completa, por ejemplo, p55<sup>gag</sup>.

Adicionalmente, en el presente documento se describe un método para inducir una amplia respuesta inmunitaria que incluye aquellos que se dirigen a los elementos muy conservados, comprendiendo el método la vacunación con ADN de CEvac y ADN de gag de forma secuencial o mediante inmunización conjunta, en el que después de la vacunación con el inmunógeno p55gag de longitud completa no se producen respuestas. Esta estrategia de vacunación supera el problema de diversidad al generar respuestas inmunitarias específicas de clados cruzados de gag y amplia la inmunidad humoral y de linfocitos T inducida por p55gag. Las vacunas pueden suministrarse como vacunas de ADN, por ejemplo, vacunas de ADN plasmídico. En algunos casos, las vacunas se suministran como vacunas de adenovirus o como vacunas del virus de la varicelovacuina, o se utiliza otra estrategia de vacunación basada en vectores de virus.

La presente divulgación proporciona además composiciones de vacuna que comprenden un ácido nucleico que codifica seis o siete elementos muy conservados de p24gag. En algunos casos, Los elementos codificados por el ácido nucleico se disponen colinealmente. En algunos casos, para una eficaz escisión proteolítica, los siete elementos están separados por enlazadores de alanina. En algunos casos, los vectores de ADN están diseñados para expresar solamente proteínas de la nucleocápside (polipéptidos de elementos conservados que comprenden múltiples elementos conservados), para expresar proteínas de la nucleocápside (*Core*) secretadas que tienen el péptido señal de GM-CSF (PSNucleocápside) en el extremo N o para expresarse como una fusión de nucleocápside con la quimiocina proteína 3 quimioatrayente de monocitos (MCP3) para estabilizar la expresión de la proteína y mejorar la secreción de las proteínas, o con la proteína 1 de membrana asociada al lisosoma (LAMP-1, del inglés *lysosomal associated membrane protein 1*) para dirigir a las proteínas al compartimento lisosomal, incluido el acceso a la ruta del MHC (complejo principal de histocompatibilidad, del inglés *major histocompatibility complex*) de clase II.

Un método de la presente divulgación puede comprender administrar un ácido nucleico que codifique un elemento conservado de una proteína, por ejemplo, una proteína vírica, tal como Gag, y un ácido nucleico que codifique una variante natural del elemento conservado, en el que la variante se diferencia del elemento conservado en 1 aminoácido, por ejemplo, en el que el elemento conservado tiene una longitud de 8 aminoácidos; o tiene una identidad de secuencia de al menos 80 %, por lo general de al menos 90 %, o mayor, con el elemento conservado. En algunos casos, la variante puede diferir del elemento conservado en 1, 2 o 3 aminoácidos. Los ácidos nucleicos que codifican el elemento conservado y la variante del elemento conservado pueden estar presentes en el mismo vector o estar codificados por diferentes vectores. En algunos casos, el elemento conservado es de gag del VIH. En algunos casos en los que se administran un ácido nucleico que codifica un elemento conservado y un ácido nucleico que codifica al menos una variante del elemento conservado, las secuencias del elemento conservado y de la variante del elemento conservado representan, en conjunto, al menos el 80 %, o al menos el 90 %, por lo general, al menos el 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de las variantes naturales de la proteína. En algunas realizaciones, los elementos inmunogénicos conservados se construyen basándose en el "enfoque regional", que representará > 80 % del clado C del VIH-1 o del clado B del VIH-1. Dicha estrategia, por ejemplo, proporciona vacunas más específicas.

Por tanto, la presente divulgación describe un método para generar una amplia respuesta inmunitaria, comprendiendo el método administrar a un individuo un ácido nucleico que codifique al menos tres elementos conservados, por lo general, al menos 4, 5 o 6, o más elementos conservados, de una proteína de interés, y administrar al individuo un ácido nucleico que codifique la proteína de longitud completa. El elemento conservado puede proceder de proteínas víricas muy diversas, por ejemplo, de una proteína del VIH, tal como gag o env.

Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un primer y segundo ácido nucleico de elemento conservado de gag y un ácido nucleico que codifica una proteína p55<sup>gag</sup> del VIH de longitud completa para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, comprendiendo el método, administrar al sujeto el primer ácido nucleico de elemento conservado de gag, que codifica un primer polipéptido de elemento conservado de p24<sup>gag</sup> del VIH-1 que comprende siete elementos conservados de p24<sup>gag</sup> del VIH-1, en el que cada uno de los elementos conservados tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 1-7; y los elementos conservados no son contiguos y están unidos por secuencias peptídicas enlazadoras; administrar el segundo ácido nucleico de elemento conservado de gag, que codifica un segundo polipéptido de elemento conservado de p24<sup>gag</sup> del VIH-1 que comprende los elementos conservados expuestos en las SEC ID NO: 8-14; y

administrar el ácido nucleico que codifica la proteína p55<sup>Gag</sup> del VIH de longitud completa, en el que el ácido nucleico que codifica la proteína p55<sup>Gag</sup> del VIH de longitud completa se administra después del primer y el segundo ácido nucleico de elemento conservado de *gag*.

5 En una realización, el primer ácido nucleico de elemento conservado de *gag* codifica un polipéptido de elemento conservado de p24<sup>Gag</sup> del VIH-1 que comprende la secuencia de SEC ID NO: 15 y el segundo ácido nucleico de elemento conservado de *gag* codifica un polipéptido de elemento conservado de p24<sup>Gag</sup> del VIH-1 que comprende la secuencia de SEC ID NO: 16. En una realización, (a) el primer y segundo ácido nucleico de elemento conservado de *gag* se administran secuencialmente; o (b) el primer y segundo ácido nucleico de elemento conservado de *gag* se administran simultáneamente.

10 En algunas realizaciones, cada uno de los polipéptidos de elemento conservado codificado por el primer y segundo ácido nucleico de los ácidos nucleicos de elemento conservado de *gag*, se fusionan con un péptido señal GM-CSF. En algunas realizaciones, (a) el primer y segundo ácido nucleico de los ácidos nucleicos de elemento conservado de *gag* están contenidos en el mismo vector; o (b) el primer y segundo ácido nucleico de los ácidos nucleicos de elemento conservado de *gag* están contenidos en vectores diferentes. En una realización, las construcciones de ácido nucleico se administran por vía intramuscular mediante electroporación *in vivo*. En una realización, cada elemento conservado consiste en una secuencia de aminoácidos de 12-30 aminoácidos de longitud.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un agente seleccionado de:

- (i) un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 15 y un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 16; o
- (ii) un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de

25

QGQMVHQAI SPRTLNAWVKVLAKEEKAFSPEVIPMF SALSEGATPQDLNAAKVGGH  
QAAMQMLKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEIQGWAAAKRWIILGLNKI  
VRMYSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQA

y un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de

30

QGQMVHQAL SPRTLNAWVKVLAKEEKGFNPEVIPMFTAL SEGATPQDLNAAKVGG  
HQAAMQMLKDTINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEQIAWAAAKRWIILGLN  
KIVRMYS PVSIAAKYVDRFFKTLRAEQA;

- o
- (iii) un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de

35

E EKAFSPEVIPMF SALSEGATPQDLNAAKVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRAAA  
EPRGSDIAGTTSTLQEIQGWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVDRFYKTLRAE  
QAALQGQMVHQAI SPRTLNAWVKV

y un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de

40

E EKGFNPEVIPMFTAL SEGATPQDLNAAKVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRAA  
AEPRGSDIAGTTSTLQEQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYS PVSIAAKYVDRFFKTLRA  
EQAALOGQMVHQAL SPRTLNAWVKV,

y un ácido nucleico que codifica a p55<sup>Gag</sup> para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria contra una proteína Gag del VIH, comprendiendo el método

- (a) administrar (i), (ii) o (iii) y
- (b) administrar el ácido nucleico que codifica la proteína p55<sup>Gag</sup> después de administrar (i), (II) o (III).

45

En una realización, (a) el polipéptido de SEQ ID NO: 15 y el polipéptido de SEQ ID NO: 16; o el polipéptido de

QGQMVHQAI SPRTLNAWVKVLAKEEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNAAKVGGH  
QAAMQMLKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEIQIWAAAKRWIILGLNKI  
VRMYSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQA

y el polipéptido de

QGQMVHQALSPRTLNAWVKVLAKEEKGFNPEVIPMFTALSEGATPQDLNAAKVGG  
HQAAMQMLKDTINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEIQIAWAAAKRWIILGLN  
KIVRMYS PVSIAAKYVDRFFKTLRAEQA;

5

o el polipéptido de

E EKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNAAKVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRAAA  
EPRGSDIAGTTSTLQEIQIWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVDRFYKTLRAE  
QAALQGQMVHQAI SPRTLNAWVKV

10

y el polipéptido de

E EKGFNPEVIPMFTALSEGATPQDLNAAKVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRAA  
AEPRGSDIAGTTSTLQEIQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYS PVSIAAKYVDRFFKTLRA  
EQAALQGQMVHQALSPRTLNAWVKV

15 están codificados por el mismo vector; y/o

(b) el polipéptido de SEQ ID NO: 15 y el polipéptido de SEQ ID NO: 16; o el polipéptido de

QGQMVHQAI SPRTLNAWVKVLAKEEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNAAKVGGH  
QAAMQMLKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEIQIWAAAKRWIILGLNKI  
VRMYSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQA

20

y el polipéptido de

QGQMVHQALSPRTLNAWVKVLAKEEKGFNPEVIPMFTALSEGATPQDLNAAKVGG  
HQAAMQMLKDTINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEIQIAWAAAKRWIILGLN  
KIVRMYS PVSIAAKYVDRFFKTLRAEQA;

25 o el polipéptido de

E EKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNAAKVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRAAA  
EPRGSDIAGTTSTLQEIQIWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVDRFYKTLRAE  
QAALQGQMVHQAI SPRTLNAWVKV

30 y

EEKGFNPEVIPMFTALSEGATPQDLNAAKVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRAA  
 AEPRGSDIAGTTSTLQEQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYSVSIAAKYVDRFFKTLRA  
 EQAALQGQMVHQALSPRTLNAWVKV

están fusionados con un péptido señal GM-CSF.

- 5 En una realización, (a) los ácidos nucleicos se administran por vía intramuscular seguido de electroporación *in vivo*; y/o (b) el ácido nucleico que codifica la proteína p55<sup>Gag</sup> se administra al menos dos semanas después de la etapa (a).

La presente divulgación también desvela un método de inducción de una respuesta inmunitaria en un paciente, comprendiendo el método administrar al sujeto un primer ácido nucleico de elemento conservado de Gag, que codifique un primer polipéptido de elemento conservado de Gag ("polipéptido CE1") que comprende seis elementos conservados de Gag, en el que los elementos conservados son de diferentes regiones de Gag, y además, en el que cada elemento conservado tiene una longitud de al menos 12 aminoácidos, pero una longitud menor de 30 aminoácidos y los elementos conservados no son contiguos; y administrar un ácido nucleico que codifique una proteína Gag de longitud completa. En algunos casos, los elementos conservados son de p24gag del VIH-1. En algunos casos, el primer polipéptido de elemento conservado comprende al menos un elemento conservado que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEC ID NO: 1-7, 32 o 33. En algunos casos, el primer polipéptido de elemento conservado comprende al menos dos,

tres, cuatro, cinco o seis elementos conservados que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEC ID NO: 1-7, 32 o 33. En un caso, el primer polipéptido de elemento conservado comprende elementos conservados que tienen, cada uno de ellos, una secuencia expuesta en las SEC ID NO: 1-7; o el primer polipéptido de elemento conservado comprende elementos conservados que tienen, cada uno de ellos, una secuencia expuesta en las SEC ID NO: 3-6, 32 y 33.

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además la administración de un segundo ácido nucleico de elemento conservado de Gag que codifique un segundo polipéptido de elemento conservado de Gag ("polipéptido CE2") que comprende al menos una variante de un elemento conservado contenido en el primer polipéptido de elemento conservado de Gag, en el que la variante en el 2º polipéptido se diferencia de la variante en el primer polipéptido en 1, 2 o 3 aminoácidos. Por lo general, la variante del elemento conservado se diferencia del elemento conservado solo en 1 aminoácido. En algunos casos, cada uno del elemento conservado y la variante del elemento conservado, tiene una secuencia expuesta en la Figura 1; o en la Figura 13. En un caso, el primer polipéptido de elemento conservado comprende la secuencia de SEC ID NO: 15 y el segundo polipéptido de elemento conservado de Gag comprende la secuencia de SEC ID NO: 16. En algunos casos, el primer polipéptido de elemento conservado comprende la secuencia de p24CE1c y el segundo elemento conservado comprende la secuencia de p24CE2c como se muestra en la Figura 13. En algunos casos, el primer polipéptido de elemento conservado comprende la secuencia de p24CE1d y el segundo elemento conservado comprende la secuencia de p24CE2d como se muestra en la Figura 13. El primer y segundo ácido nucleico de elemento conservado de Gag, se administran secuencial o simultáneamente. En algunos casos, uno o más de los polipéptidos de elementos conservados comprenden un péptido señal, tal como GM-CSF o MCP-3. En algunos casos, uno o más de los polipéptidos de elementos conservados comprenden una secuencia que se dirige a la proteína para su degradación, por ejemplo, una secuencia LAMP. El primer y segundo ácido nucleico de los polipéptidos de elemento conservado de Gag pueden estar codificados por el mismo vector. Como alternativa, el primer y segundo ácido nucleico de los polipéptidos de elemento conservado de Gag pueden estar codificados por vectores diferentes. Los ácidos nucleicos que codifican el primer y segundo polipéptido de elemento conservado pueden administrarse múltiples veces. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica la proteína Gag de longitud completa se administra después de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de elemento conservado, por ejemplo, al menos 2 semanas o 4 semanas, o más, después de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de elemento conservado.

Adicionalmente, en el presente documento se describe un método para inducir una respuesta inmunitaria contra una proteína gag del VIH, comprendiendo el método

- (a) administrar a un sujeto: (i) un ácido nucleico que codifique un polipéptido que comprenda la SEC ID NO: 15 y un ácido nucleico que codifique un polipéptido que comprenda la SEC ID NO: 16; o

- (ii) un ácido nucleico que codifique un polipéptido que comprenda p24CE1c como se muestra en la Figura 13 y un ácido nucleico que codifique un polipéptido que comprenda p24CE2c como se muestra en la Figura 13; o  
 (iii) un ácido nucleico que codifique un polipéptido que comprenda p24CE1d como se muestra en la Figura 13 y un ácido nucleico que codifique un polipéptido que comprenda p24CE2d como se muestra en la Figura 13; y

- (b) administrar un ácido nucleico que codifique p55gag.

Los pares de ácidos nucleicos expuestos en (i), (ii) o (iii) de la etapa (a), pueden codificarse por el mismo vector. En

algunos casos, los polipéptidos están fusionados con un péptido señal GM-CSF. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica p55gag se administra al menos dos semanas después de la etapa (a).

5 Adicionalmente aún, en el presente documento se describe un método para inducir una respuesta inmunitaria contra una proteína gag del VIH, comprendiendo el método administrar al paciente al menos un ácido nucleico que codifique un polipéptido de elemento conservado que comprenda una secuencia expuesta en SEC ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO:37 o SEQ ID NO:39; y administrar un ácido nucleico que codifique una proteína gag de longitud completa. En algunos casos, la proteína gag de longitud completa se administra al menos 2 semanas después de administrar el  
10 ácido nucleico que codifica el polipéptido de elemento conservado.

En el presente documento también se describe un método de inducción de una respuesta inmunitaria contra una proteína de interés, comprendiendo el método administrar un ácido nucleico que codifique al menos un polipéptido conservado, en el que los elementos conservados son de la proteína de interés y el polipéptido comprende al menos tres elementos conservados, cada uno de una longitud menor de 30 aminoácidos en el que los elementos conservados se unen mediante enlazadores; seguido de la administración de un ácido nucleico que codifique la proteína de longitud completa, en el que el ácido nucleico que codifica la proteína de longitud completa se administra al menos dos semanas después del ácido nucleico que codifica el polipéptido de elemento conservado.  
15

20 En algunos casos, las construcciones de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de elementos conservados y el polipéptido Gag de longitud completa se administran por vía intramuscular mediante electroporación *in vivo*.

### Breve descripción de los dibujos

25 Figura 1: Diseño de la vacuna de ADN p24CE. (A) Alineamiento de las secuencias de la proteína HXB2 p24<sup>99g</sup> con los clados de consenso A, B y C y el consenso del Grupo M, el Centro de Árbol del Grupo M (COT-M, del inglés *Center-of-Tree-M*) y los 7 CE (elementos conservados) incluidos en p24CE1 y p24CE2. Entre las secuencias CE1 y CE2 se indican diferencias de aminoácidos 'alternos'. (B) Localización del CE dentro de la estructura de p24<sup>99g</sup> hexamérica. La estructura de p24<sup>99g</sup> está modificada de la de Pornillos et al. [97] y muestra la localización de CE1-CE7 (rojo), del AA alterno (azul) y del AA no incluido en el CE (negro). La estructura cristalina del hexámero se obtuvo en la dirección [www http ebi.ac.uk/pdbsum](http://www.ebi.ac.uk/pdbsum) (C) de gráficos de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle de dos disposiciones colineales diferentes de los CE. (D) Las proteínas p24CE (p24CE1 y p24CE2) están compuestas por 7 CE dispuestos colinealmente y unidos a través de enlazadores de aminoácidos. La proteína PS-p24CE secretada contiene el péptido señal GMCSF. MCP3-p24CE es una proteína de fusión con la quimiocina proteína 3 quimioatrayente de monocitos (MCP-3). LAMP-p24CE es una fusión con la proteína 1 de membrana asociada al lisosoma (LAMP-1).  
30  
35

Figura 2: Expresión de los plásmidos p24CE después de transfección transitoria en células cultivadas. El ADN plasmídico (1 µg) que expresaba diferentes variantes de las proteínas p24CE1 (panel de la izquierda) o p24CE2 (panel de la derecha), se transfectó en células HEK293. Los cultivos se recogieron 24 horas más tarde y las proteínas de las mismas cantidades (1/250) de las fracciones asociadas a células (panel superior) y extracelulares (panel inferior) se resolvieron en un gel Bis-Tris de NuPAGE al 12 % y se analizaron por inmunotransferencia de Western utilizando un antisuero anti p24<sup>99g</sup> de cabra y se visualizaron utilizando ECL (del inglés *enhanced chemiluminescence*, quimioluminiscencia mejorada). La membrana que contenía las fracciones asociadas a células también se exploró con un anticuerpo anti pan actina humana para controlar la misma carga de las muestras.  
40  
45

Figura 3: Respuestas celulares en ratones C57BL/6 vacunados con ADN p24CE. Los ratones se vacunaron utilizando EP *in vivo* con 20 µg de los plásmidos de ADN de p24CE1 (panel de la izquierda) o p24CE2 (panel de la derecha) indicados (A, B) o con ADN de PS-p24CE1 (C). Los esplenocitos de animales individuales se estimularon (A) con el grupo peptídico de consenso del Grupo M (péptidos de 15 oligómeros que se solapan con 11 AA), (B) con el conjunto de péptidos del COT-M (10 oligómeros que se solapan en 9 AA) que consiste en los péptidos correspondientes de las proteínas p24CE1 y p24CE2, y (C) con conjuntos de péptidos que representan las secuencias de p55<sup>99g</sup> de los Clados A, B y C (péptidos de 15 oligómeros que se solapan en 11 AA), como se describe en Materiales y Métodos. La frecuencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (barras blancas) y CD8<sup>+</sup> (barras negras) productores de IFN-γ específicos de CE, se determinó mediante citometría de flujo policromática. Se muestra la media y la desviación típica media (DTM). Se realizaron tres experimentos y se muestran los datos de un experimento representativo.  
50  
55

Figura 4: Mapeo de las respuestas inmunitarias celulares inducidas por p24CE. Los esplenocitos agrupados de ratones C57BL/6 (N=5) vacunados con los ADN indicados de p24CE1 (paneles de la izquierda) o p24CE2 (paneles de la derecha), se estimularon con los conjuntos de péptidos de consenso del Grupo M (15 oligómeros que se solapan en 11 AA) que abarcan los CE individuales. Se midió la frecuencia de los linfocitos T productores de IFN-γ y específicos de CE. Se muestran los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (barras blancas) y CD8<sup>+</sup> (barras negras) específicos de Gag.  
60  
65

Figura 5: Análisis fenotípico y funcional de las respuestas de linfocitos T generadas mediante la vacunación de ADN de p55<sup>gag</sup> y p24CE. (A) Los ratones (N=5/grupo) se vacunaron 3 veces (semana 0, 3 y 6) con 20 µg de un plásmido que expresaba HXB2 p55<sup>gag</sup> (clado B) o con 20 µg de una mezcla de plásmidos que expresaban PS-p24CE1 y PS-p24CE2. Los ratones se sacrificaron 2 semanas después de la última inmunización. Se realizaron tres experimentos independientes y se muestra un experimento representativo. (B) Los esplenocitos agrupados se estimularon con conjuntos de péptidos de los clados A, B o C (15 oligómeros) que abarcan la región p24<sup>gag</sup> (panel de la izquierda) y con el conjunto de péptidos de consenso del Grupo M (panel de la derecha). Se determinó la frecuencia de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (barras blancas) y CD8<sup>+</sup> (barras negras) productores de IFN-γ específicos de p24<sup>gag</sup>. (C) Los esplenocitos de los ratones vacunados con ADN de PS-24CE (panel de la izquierda) y de p55<sup>gag</sup> (panel de la derecha) se estimularon con conjuntos de péptidos específicos de CE individuales. Se determinó la frecuencia de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (barras blancas) y CD8<sup>+</sup> (barras negras) productores de IFN-γ específicos de CE. D) Los solapamientos de la gráfica muestran la caracterización fenotípica y funcional de los linfocitos T específicos de antígeno inducida por las vacunas de ADN de las proteínas PS-p24CE (paneles de la izquierda) y p55<sup>gag</sup> (paneles de la derecha) después de la estimulación con el grupo peptídico específico de p24<sup>gag</sup>. EL total de linfocitos T recuperado del bazo se muestra como contornos grises, y los linfocitos T productores de IFN-γ<sup>+</sup> específicos de antígeno, se solapan como puntos rojos (linfocitos T CD4<sup>+</sup>) o negros (linfocitos T CD8<sup>+</sup>). Las gráficas muestran la distribución de CD4/CD8 (panel superior), el fenotipo de memoria determinado por tinción de CD44/CD62L (panel central) y la expresión de TNFα/CD107a (panel inferior) entre los linfocitos T de ratones vacunados. Se muestra la frecuencia de linfocitos T CD4 (rojo) y CD8 (negro) productores de IFN-γ<sup>+</sup>.

Figura 6: Respuestas inmunitarias humorales en ratones vacunados con ADN de p24CE. (A) Los anticuerpos anti p24<sup>gag</sup> del VIH-1 se midieron en plasma de ratones C57BL/6 vacunados con ADN de p24CE y p55<sup>gag</sup> mediante un ensayo ELISA convencional de p24<sup>gag</sup> clado B. Los gráficos muestran la absorbancia (densidad óptica, DO) y las diluciones de muestras de plasma agrupadas de ratones vacunados con los diferentes ADN plasmídicos de p24CE1 (panel superior), p24CE2 (panel central) o p55<sup>gag</sup> (panel inferior). (B) Las respuestas humorales inducidas después de la vacunación con ADN de las proteínas PS-p24CE o p55<sup>gag</sup> en los ratones, se analizaron mediante ensayos de inmunotransferencia de Western. Las membranas contienen proteína p24<sup>gag</sup> recogida de sobrenadantes de células HEK293 transfectadas con 5 µg del clon molecular infeccioso pNL4-3 (carril 1) o las proteínas p24CE recogidas de las fracciones asociadas a células de células transfectadas con los plásmidos PS-p24CE1 y PS-p24CE2 (carriles 2 y 3, respectivamente). Las membranas se exploraron con plasma (dilución 1:5000) de ratones vacunados con una mezcla de los ADN de PS-p24CE1 y 2 (panel superior) o ADN de p55<sup>gag</sup> (panel inferior) seguido de anticuerpo anti IgG de ratón marcado con HRP y se visualizaron con ECL. C) Detección de respuestas humorales contra p55<sup>gag</sup> de longitud completa en ratones vacunados con ADN de p24CE o p55<sup>gag</sup> mediante ensayo de inmunotransferencia de Western. Las proteínas p55<sup>gag</sup> se obtuvieron de células HEK293 transfectadas con 0,5 µg de plásmidos de ARN/ optimizados con codones, que expresaban la proteína p55<sup>gag</sup> no procesada de los clados A, B y C o COT-M, respectivamente. Las proteínas se resolvieron en geles Bis-Tris de NuPAGE al 10 % y las membranas se exploraron con plasma (dilución 1: 200) de ratones inmunizados con los ADN que expresaban las proteínas p24CE secretadas PS-p24CE1 (panel superior), PS-p24CE2 (panel central) y p55<sup>gag</sup> (panel inferior).

Figura 7: La vacunación de macacos con ADN de p55<sup>gag</sup> induce respuestas inmunitarias celulares pobres específicas de CE. (A) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos (AA) de los 7 CE representados en las proteínas p24CE1 y p24CE2 con la proteína HXB2 p24<sup>gag</sup>. En cada CE se muestra el AA alterno. La numeración del AA en la proteína HXB2 p24<sup>gag</sup> es conforme a la base de datos del VIH en el sitio [www.hiv.lanl.gov/](http://www.hiv.lanl.gov/). (B) Tanto las respuestas de linfocitos T específicas de p24<sup>gag</sup> como las de CE se midieron 2 semanas después de la última vacunación de 11 macacos, que se inmunizaron con ADN plasmídico que codificaba la Gag del VIH. (C) Mapeo de las respuestas individuales específicas de CE en 5 (de 11) macacos que tuvieron respuestas a CE (panel B). Se muestra la frecuencia de linfocitos T IFN-γ<sup>+</sup> específicos para cada uno de los 7 CE. Barras blancas: linfocitos T CD4<sup>+</sup>; barras negras: linfocitos T CD8<sup>+</sup>. (D). Diagramas de puntos que muestran la producción de IFN-γ<sup>+</sup> y granzima B (GzmB) de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (rojo) y CD8<sup>+</sup> (negro) específicos de CE de los 5 macacos que se muestran en el panel C.

Figura 8: Respuestas inmunitarias celulares específicas de CE después de la vacunación de macacos con los ADN de p24CE. (A) Los macacos se vacunaron con ADN de p24CE y la frecuencia de los linfocitos T específicos de CE se midió 2 semanas después de la 2ª vacunación (EP2sem2). Se muestran los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (barras blancas) y CD8<sup>+</sup> (barras negras) productores de IFN-γ<sup>+</sup>. B) Mapeo de respuestas individuales específicas de CE en los 6 macacos inmunizados del panel A. Se muestra la frecuencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (barras blancas) y CD8<sup>+</sup> (barras negras) productores de IFN-γ<sup>+</sup>. (C) En el panel superior se muestra la caracterización fenotípica de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (rojo) y CD8<sup>+</sup> (negro) específicos de CE con CD28<sup>+</sup> CD95<sup>+</sup> (fenotipo de memoria central) o CD28<sup>-</sup> CD95<sup>+</sup> (fenotipo de memoria efectora); En el panel inferior se muestra la expresión de IFN-γ<sup>+</sup> y de la granzima B.

Figura 9: Inducción de respuestas de linfocitos T amplias y polifuncionales en macacos vacunados con p24CE. A) Se muestra el número de CE reconocido por animal en macacos vacunados con ADN de p24CE y ADN de p55<sup>gag</sup>. (B) Se evaluó la frecuencia de linfocitos T polifuncionales específicos de CE por su capacidad para producir IFN-γ, TNF-α, CD107a y granzima B (GzmB). Se muestran los datos de un macaco representativo de cada grupo: M437 (panel superior) vacunado con ADN de p24CE; P574 (panel central) vacunado con ADN de p55<sup>gag</sup>. Los

gráficos circulares (derecha) muestran la proporción de respuestas polifuncionales en estos macacos. Se muestra (panel inferior) la frecuencia de linfocitos T polifuncionales (4 funciones) específicos de CE productores de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, CD107a<sup>+</sup> y GzmB<sup>+</sup> como % del total de linfocitos T en macacos vacunados con ADN de p24CE y ADN p55gag, respectivamente. Se indican valores medianos.

5  
10  
Figura 10: El refuerzo con ADN de p55<sup>gag</sup> de los macacos sensibilizados con ADN de p24CE, aumenta las respuestas celulares específicas de CE. (A) Programa de vacunación del grupo 1 con ADN plasmídicos de p24CE (EP1, EP2) seguido del refuerzo de ADN de p55<sup>gag</sup> heterólogo (EP3) y del grupo 2 con ADN de p55<sup>gag</sup> (EP1, EP2) seguido del refuerzo de ADN de p24CE heterólogo (EP3). (B) Frecuencia de linfocitos T específicos de CE productores de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en ambos grupos antes (EP2sem2) y después (EP3sem2) del refuerzo con ADN heterólogo. (C) Frecuencia de linfocitos T polifuncionales específicos de CE productores de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup>GzmB<sup>+</sup> (4 funciones) en los grupos 1 y 2 antes y después del refuerzo de ADN heterólogo.

15  
Figura 11: Mapeo de respuestas de linfocitos T específicos de CE antes y después del refuerzo de ADN heterólogo. Las respuestas específicas de CE se mapearon como se describe en la Fig. 2B. Las gráficas muestran comparaciones de las respuestas sobre la vacunación con ADN de p24CE seguida por refuerzo con ADN de p55<sup>gag</sup> (grupo 1, A) y sobre la vacunación con ADN de p55<sup>gag</sup> seguido de refuerzo con p24CE (grupo 2, B). Se muestra el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (barras blancas) y CD8<sup>+</sup> (barras negras) productores de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>.

20  
25  
Figura 12: Después de la vacunación con ADN de p24CE, las respuestas inmunitarias humorales se refuerzan con la vacunación con ADN de p55<sup>gag</sup>. (A) Títulos de criterios de valoración de anticuerpos de unión a p24<sup>gag</sup> recíprocos (log) medidos en plasma por ELISA en los puntos de tiempo indicados para los macacos en el grupo 1 y el grupo 2 antes y después de los refuerzos con ADN heterólogo. (B) Para ensayar la reactividad de los anticuerpos inducidos por la vacuna en los macacos de los grupos 1 y 2 contra las proteínas p24<sup>gag</sup> y p24CE, se utilizó análisis de inmunotransferencia de Western. Las membranas contienen las proteínas p24<sup>gag</sup> (carriles 1 y 4), p24CE1 (carriles 2 y 5) o p24CE2 (carriles 3 y 6) y se exploraron con plasma de macacos del grupo 1 (dilución 1:2000) y del grupo 2 (dilución 1:500) recogido antes (EP2sem2; carriles 1-3) y después (EP3sem2, carriles 4-6) del refuerzo con ADN heterólogo.

30  
Figura 13: Secuencias y configuraciones de los polipéptidos p24CEc y p24CEd.

Figura 14: Mapa plasmídico (A) y secuencia (B) del plásmido 306H que codifica los polipéptidos p24 CE1+p24 CE2.

35  
Figura 15: Mapa plasmídico (A) y secuencia (B) del plásmido 202H que codifica a LAMP-p24CE2.

Figura 16: Mapa plasmídico (A) y secuencia (B) del plásmido 191H que codifica a LAMP-p24CE1.

Figura 17: Mapa plasmídico (A) y secuencia (B) del plásmido 230H que codifica a MCP3-p24CE1.

40

Figura 18: Mapa plasmídico (A) y secuencia (B) del plásmido 231H que codifica a MCP3-p24CE2.

Figura 19: Mapa plasmídico (A) y secuencia (B) del plásmido 235H que codifica a PS-p24CE2.

45  
Figura 20: Regímenes ilustrativos para la administración de vacunas Gag con elementos conservados y vacunas p55gag de longitud completa.

50  
Figura 21: Datos ilustrativos que muestran las respuestas inmunitarias celulares antes y después del refuerzo. Las respuestas inmunitarias celulares se midieron con péptidos (solapamiento de 15 oligómeros en 11 aminoácidos) que abarcaban toda la proteína p24gag.

55  
Figura 22: Análisis de las respuestas a CE individuales. Las respuestas a cada CE se mapearon en todos los animales utilizando péptidos específicos de CE (mezcla de péptido de 10 oligómeros que se solapa en 9 aminoácidos y de 15 oligómeros que se solapa en 11 aminoácidos) para cada CE. Se muestra el número de CE que mostró respuestas positivas por animal.

Figura 23: Diferentes estrategias de vacunación indujeron niveles similares de respuestas de anticuerpos contra p27gag. Los títulos de anticuerpos de unión se midieron en el plasma mediante ELISA.

## 60 Descripción detallada de la invención

### Definiciones

65 Un "elemento conservado", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de proteína que se conserva en toda una proteína que tiene una alta diversidad de secuencias en la naturaleza, por ejemplo, una proteína vírica, tal como una proteína gag. El elemento conservado no precisa tener una identidad de secuencia del 100 % en

5 toda la diversidad de secuencias naturales de la proteína, pero la variabilidad de secuencia en las secuencias naturales es baja, por ejemplo, inferior al 20 %. En algunas realizaciones, la variabilidad de secuencia es inferior al 10 %. Un elemento conservado suele tener una longitud de ocho aminoácidos, o mayor, por ejemplo, de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos. Por lo general, un elemento conservado tiene una longitud menor de 50 aminoácidos y, a menudo, menor de 40 o menor de 30 aminoácidos. En algunas realizaciones, un elemento conservado tiene una longitud menor de 25 aminoácidos.

10 Una "vacuna de ácido nucleico", como se usa en este documento, incluye ambas vacunas de ADN desnudo, por ejemplo, una vacuna de plásmidos y vacunas de ácidos nucleicos basadas en vectores víricos que están comprendidas por un vector vírico y/o suministradas como partículas víricas.

15 A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también engloba implícitamente variantes de la misma modificadas de manera conservativa (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Pueden obtenerse sustituciones de codones degenerados generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con restos de base mixta y/o de desoxiinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)). La expresión "ácido nucleico" se utiliza indistintamente con gen, ADNc, oligonucleótido y polinucleótido. Un "ácido nucleico" engloba ARN así como ADN.

20 Los términos "idéntico(a)" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o de nucleótidos que son iguales (por ejemplo, aproximadamente un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o una identidad más alta en una región específica (una secuencia de polipéptidos que comprende elementos conservados), cuando se comparan y se alinean para obtener una correspondencia máxima en una ventana de comparación o región designada) tal como se mide utilizando algoritmos de comparación de secuencias como BLAST o BLAST 2.0 con los parámetros predeterminados descritos a continuación, o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, el sitio web de la NCBI o similares). por tanto, se dice que dichas secuencias son "sustancialmente idénticas". Esta definición también se refiere, o puede aplicarse, al complemento de una secuencia de ensayo. La definición también incluye secuencias que tienen delecciones y/o adiciones, así como aquellas que tienen sustituciones. Como se describe a continuación, los algoritmos preferidos pueden explicar huecos y similares. Preferentemente, existe identidad en una región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 25, 50, 75, 100, 150, 200 aminoácidos o nucleótidos, y muchas veces en una región que tiene una longitud de 225, 250, 300, 350, 400, 450, 500 aminoácidos o nucleótidos o en toda la longitud de un aminoácido o secuencias de ácido nucleico.

35 Para establecer comparaciones de secuencias, por lo general, una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y referencia se introducen en un ordenador, se especifican las coordenadas de la subsecuencia, si fuera necesario, y se especifican los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Preferentemente, pueden utilizarse los parámetros predeterminados del programa, o pueden especificarse parámetros alternativos. Después, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de ensayo respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

45 Un ejemplo preferido de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencias, es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977) and Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), respectivamente. El programa informático BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information en la red mundial en [ncbi.nlm.nih.gov/](http://ncbi.nlm.nih.gov/). Pueden utilizarse parámetros predeterminados u otros parámetros no predeterminados. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLAST utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 3 y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas.

55 La expresión "unido operativamente" se refiere a un enlace funcional entre una primera secuencia de ácido nucleico y una segunda secuencia de ácido nucleico, de tal manera que la primera y la segunda secuencia de ácido nucleico se transcriben en una sola secuencia de ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico unidas operativamente no necesitan ser físicamente adyacentes entre sí. La expresión "unido operativamente" también se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de la expresión del ácido nucleico (tal como un promotor, o una matriz de sitios de unión del factor de transcripción) y una secuencia de ácido nucleico transcribible, en el que la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la secuencia transcribible.

65 En el presente documento, los aminoácidos pueden citarse bien por sus símbolos habitualmente conocidos de tres letras, o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB. Asimismo, los nucleótidos pueden citarse por sus códigos de una letra habitualmente aceptados.

Las "variantes modificadas de manera conservativa", como se usa en el presente documento, se aplican a las secuencias de aminoácidos. Un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales en un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia proteica que modifica, añade o delecciona un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada, es una "variante modificada de manera conservativa" donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. En la técnica se conocen bien tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Dichas variantes modificadas de manera conservativa son adicionales, y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecíficos, y alelos de la invención. Cada uno de los ocho grupos siguientes contiene aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
- 7) Serina (S), Treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), Metionina (M)(véase, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

Los términos "mamífero" o "animales mamíferos", se refieren a cualquier animal dentro de la clasificación taxonómica de mamíferos. Un mamífero puede referirse a un ser humano o a un primate no humano. Un mamífero puede referirse a un animal doméstico, incluyendo, por ejemplo, un canino, un felino, un roedor, incluyendo un lagomorfo, un murino, una rata, un cricetino (hámster), etc. Un mamífero puede referirse a un animal de uso agrícola, incluyendo, por ejemplo, un bovino, un ovino, un porcino, un equino, etc.

Las expresiones "respuesta inmunitaria mejorada" o "respuesta inmunitaria aumentada", como se usan en el presente documento, se refieren a una respuesta inmunitaria contra el ácido nucleico del elemento conservado y contra la proteína de longitud completa o de longitud sustancialmente completa, que se administran, en la que la respuesta inmunitaria aumenta en comparación con cuando solo se administra la vacuna de elementos conservados o la proteína de longitud completa. Una "respuesta inmunitaria mejorada" puede incluir aumentos en el nivel de activación de células inmunitarias y/o un aumento en la duración de la respuesta y/o memoria inmunológica, así como una mejora en la cinética de la respuesta inmunitaria. El aumento puede demostrarse mediante un aumento numérico, por ejemplo, un aumento en los niveles de anticuerpos en un marco de tiempo particular, según lo evaluado en un análisis para medir el análisis de respuesta o por la longevidad prolongada de la respuesta.

Los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren a retrasar la aparición de, retardar o invertir el progreso de, o aliviar o prevenir la enfermedad o la afección a la que se aplica el término, o uno o más síntomas de dicha enfermedad o afección.

Un "antígeno" se refiere a una molécula, por lo general, una molécula de proteína en la presente invención, que contiene uno o más epítopos (lineales, conformacionales o de ambos tipos) que estimulará una respuesta inmunitaria del hospedador para crear una respuesta humoral y/o celular específica de antígeno. El término se utiliza indistintamente con el término "inmunógeno". Normalmente, un epítopo comprenderá entre aproximadamente 7 y 15 aminoácidos, tal como, 9, 10, 12 o 15 aminoácidos. El término "antígeno" incluye ambos antígenos subunitarios, (es decir, antígenos que están separados y que son distintos de un organismo completo con el que el antígeno está asociado en la naturaleza), así como organismos inactivados, tales como virus.

## Introducción

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la administración a un sujeto, de uno o más ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que comprende elementos conservados de una proteína, junto con la administración de un ácido nucleico que codifica la proteína de longitud completa, o proteína de longitud sustancialmente completa, mejora la respuesta inmunitaria a las secuencias de elementos conservados. La proteína puede ser cualquier proteína, pero por lo general es una proteína vírica que exhibe diversidad de secuencia en variantes naturales. En algunos casos, la proteína vírica es una proteína retrovírica, tal como una proteína lentivírica. En algunos casos, la proteína vírica es una proteína gag o env retrovírica. Según la presente invención, la proteína vírica es una proteína gag del HIV.

La administración del ácido nucleico que codifica la proteína de longitud completa, o proteína de longitud sustancialmente completa, sigue a la administración de una construcción de ácido nucleico de elemento conservado. Por tanto, en el presente documento se describen métodos para inducir una respuesta inmunitaria, que comprenden la administración secuencial de al menos una construcción de ácido nucleico de elemento conservado, seguido de la administración de una construcción de ácido nucleico que comprende una proteína de longitud sustancialmente completa de la cual proceden los elementos conservados.

*Construcciones de ácido nucleico de elementos conservados*

Los elementos conservados de una secuencia de proteínas pueden determinarse utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20110269937, describe métodos para evaluar secuencias de proteínas que muestran una variabilidad natural para identificar regiones que están conservadas utilizando métodos informáticos.

Por lo general, una construcción de ácido nucleico de elemento conservado se genera uniendo secuencias de ácido nucleico que codifican múltiples elementos conservados que se dirigen a la secuencia conservada que está presente dentro de todas, o de un alto porcentaje, por ejemplo, al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos el 95 %, o mayor, de las variantes naturales de la proteína en una población. En realizaciones típicas, un elemento conservado es de una región de una proteína que, cuando muta, tiene efectos nocivos sobre la función de la proteína. En realizaciones típicas, un elemento conservado no comprende ninguna secuencia de aminoácidos que no aparezca en una variante natural, es decir, el elemento conservado no contiene sustituciones de aminoácidos que darían lugar a una secuencia que no se haya identificado en una variante natural.

Las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento pueden relacionarse con una proteína vírica, por ejemplo, una proteína retroviral tal como Gag. Se han identificado elementos conservados de Gag (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20110269937; Rolland et al., PLoS Pathog 3: e157, 2007; Mothe et al., PLoS One 7: e29717, 2012).

La construcción de ácido nucleico que codifica el polipéptido del elemento conservado codifica un polipéptido que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete elementos conservados expuestos en la Figura 1. En algunas realizaciones, la construcción de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende al menos 8, por lo general, al menos 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más, aminoácidos consecutivos de los elementos conservados expuestos en la Figura 1; o en las SEQ ID NO:1-14, 32, 33, 40 y 41.

Por lo general, se utiliza más de una construcción de ácido nucleico que codifica los elementos conservados cuando una construcción codifica un primer conjunto de elementos conservados y la segunda construcción codifica un segundo conjunto de elementos conservados donde uno o más elementos, a menudo cada uno de los elementos conservados, del segundo conjunto de elementos conservados difiere del primer conjunto en 3 o menos aminoácidos. Sin embargo, los restos donde las secuencias difieren, están en sitios de variación natural, de modo que cada uno de los elementos conservados en el primer y segundo conjunto corresponde a una secuencia de proteína natural. Por ejemplo, cada elemento del segundo conjunto es al menos 80 % o al menos 90 % idéntico al elemento correspondiente en el primer conjunto de secuencias conservadas. La construcción de ácido nucleico que codifica el primer conjunto de elementos conservados y la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo conjunto de elementos conservados, pueden estar presentes en el mismo vector o en vectores diferentes.

Por lo general, cada elemento conservado útil para un ácido nucleico inmunogénico administrado de acuerdo con los métodos de la invención, tiene una longitud menor de 30 aminoácidos. El elemento conservado puede tener una longitud que es menor de 25, 24, 23, 22, 21, 20 o 15 aminoácidos. En algunos casos, el elemento conservado puede tener una longitud de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos.

En la presente invención, los elementos conservados contenidos en los elementos conservados no son contiguos en la secuencia de la proteína nativa. Por lo general, en la construcción de ácido nucleico, los elementos individuales conservados se unen entre sí mediante un enlazador peptídico, tal como un enlazador de alanina. En la técnica se conocen bien secuencias enlazadoras. Las secuencias peptídicas enlazadoras típicas contienen restos de Gly, Ser, Ala y Thr. Como enlazadores útiles se incluyen polímeros de glicina-serina; polímeros de glicina-alanina; polímeros de alanina-serina. En algunas realizaciones, el enlazador de AA, AAAE, AAAA, AAK, AG, AA, LAK, AAK, AAAAL y similares.

Los elementos conservados pueden estar presentes en cualquier orden en la construcción, no siendo necesario que aparezcan en el orden de la secuencia natural. Por ejemplo, un elemento conservado que se produce contra el extremo N de una proteína puede codificarse en la región de la construcción que codifica el extremo C terminal.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de elemento conservado para su uso en la invención, codifica un polipéptido que comprende los elementos conservados expuestos en las SEC ID N°: 1-7. En algunas realizaciones, dicha construcción de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 15 ("Nucleocápside1"). En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un elemento conservado codifica un polipéptido que comprende los elementos conservados expuestos en las SEC ID NO: 8-14. En algunas realizaciones, dicha construcción de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:16 ("Nucleocápside2"). En algunas realizaciones, una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 15 se administra con una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 16.

En el presente documento también se describe un ácido nucleico que codifica un elemento conservado que codifica

los elementos conservados expuestos en las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 32, 33, 40 o 41, o una variante de los mismos que difiere en 1 aminoácido. Una variante de SEC ID NO: 33 puede diferir en 1, 2 o 3 aminoácidos. El polipéptido del elemento conservado puede comprender una secuencia expuesta en la Figura 13.

5 En la presente divulgación, una construcción de ácido nucleico de elemento conservado se administra junto con la proteína de longitud completa, o proteína de longitud sustancialmente completa, de la cual se obtienen los elementos conservados. En el contexto de la presente divulgación, "longitud sustancialmente completa" se refiere a la región de la proteína que incluye todos los elementos conservados, es decir, se proporciona una longitud suficiente de la proteína natural que incluye todos los elementos conservados que se utilizan en la construcción del elemento conservado.

10 El ácido nucleico que codifica la proteína de longitud completa puede administrarse simultáneamente con la vacuna de elementos conservados. Antes de la administración de una o más construcciones de elementos conservados, como vacuna de sensibilización, puede administrarse una proteína de longitud completa, que se administra como un refuerzo. Uno o más ácidos nucleicos que codifican elementos conservados pueden administrarse como una sensibilización y el ácido nucleico que codifica la proteína de longitud completa se administra como un refuerzo. Por lo general, el refuerzo se administra en cualquier lugar de dos semanas a uno, dos, tres o cuatro meses, o más, después de la administración de la vacuna inicial.

15 A menudo, las construcciones de ácido nucleico que codifican los elementos conservados y/o la proteína de longitud completa son una o más moléculas de ácido nucleico purificadas, por ejemplo, uno o más vectores basados en plásmidos (ADN "desnudo").

20 El componente de ácido nucleico puede comprender vectores que codifican el antígeno de interés cuando el vector está contenido dentro de un virus. Los sistemas de suministro de virus incluyen vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados (AAV, del inglés *adeno-associated viral vectors*), vectores de herpesvirus, vectores retrovíricos, vectores poxvíricos o lentivíricos. En la técnica se conocen bien métodos de construcción y uso de dichos vectores.

25 Para suministrar las moléculas de ácido nucleico que codifican los antígenos de interés, pueden usarse virus recombinantes de la familia de poxvirus (virus de la viruela). Estos incluyen virus de la variolovacuna y poxvirus de aves, tales como los virus de la viruela aviar y viruela del canario. En la técnica se conocen métodos para producir poxvirus recombinantes y emplean recombinación genética. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 91/12882, WO 89/03429 y WO 92/03545. En la patente de Estados Unidos n.º 5.863.542 hay una revisión detallada de esta tecnología. Como ejemplos representativos de poxvirus recombinantes se incluyen ALVAC, TROVAC y NYVAC.

30 También se han descrito diversos vectores de adenovirus que pueden utilizarse para suministrar uno o más de los componentes de ácido nucleico de la vacuna. (Haj-Ahmad y Graham, J. Virol. (1986) 57:267-274; Bett et al., J. Virol. (1993) 67:5911-5921; Mittereder et al., Human Gene Therapy (1994) 5:717-729; Seth et al., J. Virol. (1994) 68:933-940; Barr et al., Gene Therapy (1994) 1:51-58; Berkner, K. L. BioTechniques (1988) 6:616-629; y Rich et al., Human Gene Therapy (1993) 4:461-476). Adicionalmente, se han desarrollado varios sistemas de vectores de virus adenoasociados (AAV) para el suministro de genes. Los vectores de AAV pueden construirse fácilmente utilizando técnicas muy conocidas en la materia. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.173.414 y 5.139.941; las publicaciones internacionales n.º WO 92/01070 (publicada el 23 de enero de 1992) y WO 93/03769 (publicada el 4 de marzo de 1993); Lebkowski et al., Molec. Cell. Biol. (1988) 8:3988-3996; Vincent et al., Vaccines 90 (1990) (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. Current Opinion in Biotechnology (1992) 3:533-539; Muzyczka, N. Current Topics in Microbiol. and Immunol. (1992) 158:97-129; Kotin, R. M. Human Gene Therapy (1994) 5:793-801; Shelling y Smith, Gene Therapy (1994) 1:165-169; y Zhou et al., J. Exp. Med. (1994) 179:1867-1875.

35 Los retrovirus también proporcionan una plataforma para los sistemas de suministro de genes. Se han descrito diversos sistemas retrovíricos (patente de Estados Unidos n.º 5.219.740; Miller y Rosman, BioTechniques (1989) 7:980-990; Miller, A. D., Human Gene Therapy (1990) 1:5-14; Scarpa et al., Virology (1991) 180:849-852; Burns et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:8033-8037; y Boris-Lawrie y Temin, Cur. Opin. Genet. Develop. (1993) 3:102-109).

40 Para el suministro de genes también pueden utilizarse vectores moleculares conjugados, tales como los vectores quiméricos de adenovirus descritos en Michael et al., J. Biol. Chem. (1993) 268:6866-6869 y en Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:6099-6103.

45 Como vectores víricos para suministrar uno o más componentes de ácido nucleico de las vacunas de combinación de ácido nucleico/proteína descritas en el presente documento, también pueden utilizarse miembros del género *Alphavirus*, tales como sin limitación, vectores procedentes del virus Sindbis, del virus del bosque Semliki y del virus de la encefalitis equina venezolana. Para una descripción de vectores procedentes del virus Sindbis útiles para la práctica de los presentes métodos, véanse, Dubensky et al., J. Virol. (1996) 70:508-519; y las publicaciones internacionales n.º WO 95/07995 y WO 96/17072; así como, Dubensky, Jr., T. W., et al., la patente de Estados Unidos n.º 5.843.723, publicada el 1 de diciembre de 1998 y Dubensky, Jr., T. W., la patente de Estados Unidos n.º 5.789.245, publicada el 4 de agosto de 1998).

*Construcción de expresión que codifica polipéptidos de fusión que comprenden una señal de degradación o una secuencia de péptido señal*

5 Los ácidos nucleicos que codifican una vacuna de elementos conservados codifican una forma en la que el elemento conservado puede fusionarse con una secuencia para mejorar la respuesta inmunitaria, tal como una secuencia de péptido señal o una secuencia que se dirige a la proteína para la degradación lisosomal. Por lo general, esto produce respuestas inmunitarias mejoradas en comparación con las realizaciones en las que la vacuna de elementos conservados no está fusionada con un péptido señal o señal de degradación.

10 *Secuencias de direccionamiento al lisosoma*

También pueden emplearse señales que dirigen las proteínas al lisosoma. Por ejemplo, las proteínas 1 y 2 de membrana asociadas al lisosoma (LAMP, del inglés *lysosome associated membrane proteins* 1 y 2) incluyen una región que dirige las proteínas al lisosoma. Se proporcionan ejemplos de secuencias de direccionamiento al lisosoma, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 5.633.234, 6.248.565 y 6.294.378.

En la técnica se conocen bien secuencias desestabilizadoras presentes en proteínas particulares. Como ejemplos de secuencias desestabilizantes se incluyen c-myc aa 2-120; ciclina A aa 13-91; ciclina B aa 13-91; IκBα aa 20-45; β-Catenina aa 19-44; β-Catenina aa 18-47, c-Jun aa1-67; y c-Mos aa1-35; y fragmentos y variantes, de aquellos segmentos que actúan como mediadores en la desestabilización. Dichos fragmentos pueden identificarse fácilmente utilizando metodología muy conocida en la materia. Por ejemplo, la semivida del polipéptido puede determinarse mediante un análisis de pulso y caza que detecta la cantidad de polipéptido que está presente durante una evolución temporal utilizando un anticuerpo contra el polipéptido, o contra una etiqueta unida al polipéptido. Por ejemplo, en el documento WO02/36806, se describen ejemplos de análisis.

25 Pueden emplearse variantes de dichas secuencias, por ejemplo, que tengan una identidad de al menos 90 %, normalmente una identidad de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o mayor, con las secuencias indicadas anteriormente, por ejemplo, una secuencia de degradación de LAMP, por ejemplo, para la fusión con un polipéptido del elemento conservado de gag del VIH.

30 Señales de degradación adicionales que pueden utilizarse para modificar los antígenos retrovéricos, por ejemplo, antígenos del VIH según la invención, incluyen la señal de degradación de F-box, tal como la señal de F-BOX de 47aa (182-228) de la proteína beta TrCP (Liu, et al., *Biochem Biophys Res Comm.* 313:1023-1029, 2004). Por consiguiente, un vector de expresión para su uso según la presente divulgación puede codificar una proteína de fusión en la que una señal de degradación de F-box está unida a un antígeno del VIH, por ejemplo, gag.

*Direccionamiento al proteasoma y a otras señales de degradación*

40 En la técnica se conocen muchas secuencias de polipéptidos que se dirigen a una proteína para su degradación. Un ejemplo de secuencias desestabilizadoras son las denominadas secuencias PEST, que abundan en los aminoácidos Pro, Asp, Glu, Ser, Thr (no es necesario seguir un orden particular), y pueden aparecer en posiciones internas en una secuencia de proteínas. Diversas proteínas en las que se dice que tienen elementos de secuencias PEST se dirigen rápidamente al proteasoma 26S. Por lo general, una secuencia PEST se correlaciona con a) bucles o giros previstos expuestos a la superficie y b) sitios de fosforilación de serina, por ejemplo, el motivo S/TP es el sitio diana de las cinasas dependientes de ciclina.

Otras secuencias desestabilizadoras se relacionan con secuencias presentes en la región N-terminal. En particular la tasa de ubiquitinación, que se dirige a las proteínas para su degradación en el proteasoma 26S, puede estar influenciada por la identidad del resto N-terminal de la proteína. Por tanto, las secuencias desestabilizadoras también pueden comprender dichos restos N-terminales, de direccionamiento siguiendo la "regla *N-end*" (véase, por ejemplo, Tobery et al., *J. Exp. Med.* 185: 909-920).

Otras señales de direccionamiento incluyen la secuencia de destrucción de box que está presente, por ejemplo, en ciclinas. Dicha secuencia de destrucción de box tiene un motivo de 9 aminoácidos, R1(A/T)2(A)3L4(G)5X6(I/V)7(G/T)8(N)9, en el que los únicos restos invariables son R y L en las posiciones 1 y 4, respectivamente. Los restos mostrados entre paréntesis aparecen en la mayoría de las secuencias de destrucción. (véase, por ejemplo, Hershko & Ciechanover, *Annu. Rev. Biochem.* 67:425-79, 1998). En otros casos, las secuencias desestabilizadoras conducen a la fosforilación de una proteína en un resto de serina (por ejemplo, IκBα).

60 Un polipéptido de elemento conservado descrito en el presente documento puede fusionarse con una secuencia de degradación de LAMP. Por ejemplo, los métodos de la presente divulgación pueden emplear un polipéptido en el que la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 16 se fusiona con una secuencia de degradación de LAMP.

*Construcciones de expresión que codifican proteínas de fusión secretadas*

65 Un polipéptido secretor en el contexto de esta divulgación, es una secuencia señal polipeptídica que da como resultado

la secreción de la proteína con la que está unida. El polipéptido secretor puede ser una quimiocina, citocina o linfocina, o un fragmento de la quimiocina, citocina o linfocina, que conserva la actividad inmunoestimuladora. Los ejemplos de polipéptidos secretores de quimiocinas incluyen MCP-3 e IP-10. Como alternativa, el polipéptido secretor puede ser una secuencia señal polipeptídica de una proteína secretada, tal como la proteína activadora de plasminógeno tisular (tPA, del inglés *tissue plasminogen activator*), la hormona de crecimiento, GM-CSF, una citocina, o una proteína de inmunoglobulina. Por ejemplo, en el documento WO02/36806, se desvelan construcciones que codifican proteínas de fusión secretoras.

En algunas realizaciones de la presente invención, el péptido señal es una secuencia de GM-CSF, por ejemplo, una secuencia de GM-CSF de mamífero, tal como una secuencia de péptido señal de GM-CSF humano.

En algunos casos, una señal secretora para su uso como se describe en el presente documento es MCP-3 aminoácidos 33-109, por ejemplo, unida al péptido secretor de IP-10.

En algunas realizaciones, un polipéptido de elemento conservado está unido a una secuencia de péptido señal de GM-CSF. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos de la invención pueden emplear un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 15 fusionada con un péptido señal GM-CSF y/o un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 16 fusionada con un péptido señal GM-CSF.

De manera similar, una construcción de expresión que codifica un polipéptido de longitud completa, por ejemplo, una construcción que codifica la proteína p55 gag, también puede modificarse con una secuencia de degradación y/o una secuencia secretora. Por otra parte, puede administrarse más de una construcción que codifica el polipéptido de longitud completa, por ejemplo, p55gag. Por ejemplo, puede utilizarse una construcción en la que p55 gag se fusiona con un polipéptido señal, tal como GM-CSF, junto con una construcción en la que p55gag se fusiona con una secuencia de degradación, tal como LAMP.

#### *Propiedades adicionales de las construcciones de expresión*

Dentro de cada casete de expresión, las secuencias que codifican un antígeno para su uso en las vacunas de ácido nucleico de la invención, estarán unidas operativamente a secuencias reguladoras de la expresión. Las secuencias "unidas operativamente" incluyen tanto secuencias de control de expresión que son contiguas con al ácido nucleico de interés, como secuencias de control de expresión que actúan en trans o a distancia para controlar el gen de interés. Las secuencias de control de expresión incluyen secuencias apropiadas de inicio y terminación de la transcripción, secuencias promotoras y potenciadoras; señales de procesamiento de ARN eficaces, tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que promueven la exportación de ARN (por ejemplo, un elemento de transporte constitutivo (CTE, del inglés *constitutive transport element*), un elemento de transporte de ARN (RTE, del inglés *RNA transport element* (RTE), o sus combinaciones; secuencias que mejoran la eficacia de la traducción (es decir, secuencias de consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de las proteínas; y cuando se desea, secuencias que mejoran la secreción de las proteínas.

Para introducir directamente ácidos nucleicos en el tejido puede utilizarse cualquiera de los vectores convencionales utilizados para la expresión en células eucariotas. Los vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas se utilizan a menudo en vectores de expresión eucariotas. Dichos elementos reguladores incluyen, por ejemplo, el CMV de ser humano, el CMV de simio, LTR víricos y similares. Los vectores típicos pueden comprender, por ejemplo, los que tienen un promotor de CMV de ser humano, un sitio de poliA de la hormona del crecimiento bovino y un gen de resistencia a antibiótico para el crecimiento selectivo en bacterias.

En la técnica se conocen bien otros componentes de vectores de expresión, incluyendo, aunque sin limitación, los siguientes: elementos potenciadores de la transcripción, señales de terminación de la transcripción, secuencias de poliadenilación, sitios de corte y empalme, secuencias para la optimización del inicio de la traducción, y secuencias de terminación de la traducción.

En algunas realizaciones, el componente de ácido nucleico puede comprender una o más moléculas de ARN, tales como moléculas de ARN víricas o moléculas de ARNm que codifican el antígeno de interés.

En realizaciones típicas, las construcciones de ácido nucleico están optimizadas con codones para la expresión. En la presente invención, una molécula de "ácido nucleico" puede incluir secuencias de ADNc y de ADN genómico, secuencias de ARN y secuencias sintéticas de ácidos nucleicos. Por tanto, un "ácido nucleico" también engloba realizaciones en las que se emplean análogos de ADN y ARN.

Una composición inmunogénica de la invención puede administrarse como una o más construcciones. Por ejemplo, cuando se emplean dos conjuntos de elementos conservados, por ejemplo, los polipéptidos de elementos conservados Nucleocápside1 y Nucleocápside2, o los polipéptidos de elementos conservados p2CE1c y p24CE2c o los polipéptidos de elementos conservados p2CE1d y p24CE2d, una construcción de ácido nucleico puede codificar ambos conjuntos, o cada conjunto puede estar codificado por un vector de expresión distinto. Por tanto, las construcciones de expresión administradas según la invención, pueden administrarse como vectores de expresión múltiples, o como uno o más

vectores de expresión que codifican unidades de expresión múltiples, por ejemplo, un vector bicistrónico, o de otra manera, vectores de expresión multicistrónicos. Por ejemplo, puede emplearse un vector de expresión que codifique tanto la SEC ID NO: 15 como la SEC ID NO: 16 o pueden emplearse vectores de expresión múltiples donde un vector codifica la SEC ID NO: 15 y otro vector codifica la SEC ID NO: 16.

5

#### *Preparación de composiciones inmunogénicas*

En los métodos descritos en el presente documento, el componente de ácido nucleico a menudo se introduce directamente en las células del individuo que recibe la composición inmunogénica. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en Wolff et. al., Science 247:1465 (1990) así como en las patentes de Estados Unidos n.º 5.580.859; 5.589.466, 5.804.566, 5.739.118, 5.736.524, 5.679.647 y en el documento WO 98/04720. Como ejemplos de tecnologías de suministro basadas en ADN se incluyen, "ADN desnudo", suministro facilitado (bupivacaína, polímeros, mediado por péptidos) y complejos lipídicos catiónicos o liposomas. Los ácidos nucleicos pueden administrarse utilizando suministro balístico como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.204.253 o presión (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5,922,687). Utilizando esta técnica, se administran partículas que comprenden únicamente ADN, o en una realización alternativa, el ADN puede adherirse a partículas, tales como partículas de oro, para administración.

10

15

20

Por ejemplo, cuando un componente de ácido nucleico de la invención está codificado por un vector vírico, el componente de ácido nucleico puede suministrarse infectando las células con el virus que contiene el vector. Esto puede realizarse utilizando cualquier tecnología de suministro, por ejemplo, como la que se describe en el párrafo anterior.

25

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden administrarse mediante inyección o electroporación, o mediante una combinación de inyección y electroporación.

#### *Valoración de respuestas inmunogénicas*

Para valorar el sistema inmunológico de un paciente durante y después de un tratamiento y para evaluar adicionalmente el régimen de tratamiento, pueden medirse varios parámetros. Las mediciones para evaluar la respuesta de la vacuna incluyen: mediciones de anticuerpos en plasma, suero u otros líquidos corporales; y análisis de la proliferación celular *in vitro* en respuesta a un antígeno específico, indicando la función de los linfocitos CD4+. Dichos análisis son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, para medir los linfocitos T CD4+, muchos laboratorios miden los niveles absolutos de linfocitos T CD4+, en sangre entera mediante un proceso multiplataforma de tres fases. El número linfocitos T CD4+, es el producto de tres técnicas de laboratorio: recuento de leucocitos (o glóbulos blancos); porcentaje de leucocitos que son linfocitos (diferencial); y porcentaje de linfocitos que son linfocitos T CD4+. La última fase en el proceso de medición del porcentaje de linfocitos T CD4+ en la muestra de sangre entera se conoce como "inmunofenotipificación por citometría de flujo". En el comercio se dispone de sistemas para medir linfocitos CD4+. Por ejemplo, el sistema FACSCount de Becton Dickenson mide automáticamente linfocitos T CD4+, CD8+ y CD3+.

30

35

40

Otras mediciones de la respuesta inmunitaria incluyen valorar respuestas de CD8+. Estas técnicas son muy conocidas. Pueden medirse respuestas de linfocitos T CD8+, por ejemplo, utilizando tinción de tetrámero de PBMC recientes o cultivadas (véase, por ejemplo, Altman, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10330, 1993; Altman, et al., Science 274:94, 1996), o análisis de liberación de interferón  $\gamma$ , tales como análisis ELISPOT (véase, por ejemplo, Lalvani, et al., J. Exp. Med. 186:859, 1997; Dunbar, et al., Curr. Biol. 8:413, 1998; Murali-Krishna, et al., Immunity 8:177, 1998) o utilizando ensayos de citotoxicidad.

45

#### *Título vírico*

La viremia se mide evaluando el título vírico en un paciente. Existen diversos métodos para realizar esto. Por ejemplo, las concentraciones plasmáticas de ARN del VIH pueden cuantificarse mediante métodos de amplificación específicos (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con RT (transcriptasa inversa) [RT-PCR], ensayo de Amplicor para el control del VIH, Roche Molecular Systems; o amplificación basada en secuencias de ácido nucleico, [NASBA®], ensayo NucliSens™ HIV-1 QT, Organon Teknika) o métodos de amplificación de señal (por ejemplo ADN ramificado [ADNr], ensayo Quantiplex™ de ADNr ARN del VIH, Chiron Diagnostics). El método de amplificación de señal de ADNr amplifica la señal obtenida de una diana de ARN del VIH capturado utilizando etapas de hibridación de oligonucleótidos secuenciales, mientras que los análisis de RT-PCR y NASBA® utilizan métodos enzimáticos para amplificar el ARN del VIH diana en cantidades medibles de producto de ácido nucleico. Las secuencias de ARN del VIH diana se cuantifican por comparación con patrones de referencia internos o externos, dependiendo del análisis utilizado.

55

60

#### *Administración de construcciones de ADN*

Los vectores de ADN se formulan para su administración farmacéutica. Aunque en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento puede emplearse cualquier vehículo adecuado conocido por los expertos en la técnica, el tipo de vehículo variará dependiendo del modo de administración. Para la administración parenteral, incluida

65

- la administración intranasal, la inyección intradérmica, subcutánea o intramuscular o la electroporación, el vehículo comprende, preferentemente, agua, solución salina y, opcionalmente, un alcohol, una grasa, un polímero, una cera, uno o más aminoácidos estabilizantes o un tampón. Los expertos en la técnica conocen tecnologías de formulación general (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20ª edición), Gennaro, ed., 2000, Lippincott Williams & Wilkins; Injectable Dispersed Systems: Formulation, Processing And Performance, Burgess, ed., 2005, CRC Press; and Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, Frkjr et al., eds., 2000, Taylor & Francis).
- El ADN desnudo puede administrarse en solución (por ejemplo, en una solución salina tamponada con fosfato) mediante inyección, generalmente por vía intraarterial, intravenosa, subcutánea o intramuscular. En general, la dosis de una composición de ácido nucleico desnudo es de aproximadamente 10 µg a 10 mg para un paciente típico de 70 kilogramos. La dosis subcutánea o intramuscular de ácido nucleico desnudo (por lo general, ADN que codifica una proteína de fusión) variará de 0,1 mg a 50 mg para un paciente de 70 kg que goza de buena salud en general.
- Las composiciones inmunogénicas de ADN pueden administrarse una o más veces. La vacunación con ADN se realiza más de una vez, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20 o más veces según sea necesario para inducir la respuesta deseada (por ejemplo, una respuesta antigénica específica o proliferación de células inmunitarias). Pueden administrarse varias administraciones, por ejemplo, dos veces a la semana, semanalmente, dos veces al mes, mensualmente, o con mayor o menor frecuencia, según sea necesario, durante un período de tiempo suficiente hasta obtener la respuesta deseada.
- Las construcciones de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden administrarse a un hospedador mamífero. El hospedador mamífero suele ser un ser humano o un primate. El hospedador mamífero puede ser un animal doméstico, por ejemplo, un canino, un felino, un lagomorfo, un roedor, una rata, un hámster, un murino. Como alternativa, el hospedador mamífero puede ser un animal de uso agrícola, por ejemplo, un bovino, un ovino, un porcino, un equino, etc.
- Las composiciones inmunogénicas que contienen las construcciones de expresión de ADN pueden formularse de acuerdo con técnicas estándar bien conocidas por los expertos en la técnica farmacéutica. Dichas composiciones pueden administrarse en dosis y mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica médica teniendo en cuenta factores tales como la edad, el sexo, el peso, la afección del paciente particular y la vía de administración.
- En aplicaciones terapéuticas, las vacunas se administran a un paciente en una cantidad suficiente para suscitar un efecto terapéutico, por ejemplo, una respuesta de CD8+, CD4+ y/o de anticuerpos contra los antígenos del VIH-1 codificados por las vacunas, que detienen o retrasan al menos parcialmente, los síntomas y/o las complicaciones de la infección por VIH. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de, por ejemplo, la composición particular del régimen de vacunación administrado, la forma de administración, la fase y gravedad de la enfermedad, el estado de salud general del paciente y de criterio del médico que prescribe.
- Las cantidades adecuadas de ADN, por ejemplo, de ADN plasmídico o desnudo, pueden ser de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 mg, preferentemente de 0,1 a 10 mg, pero pueden emplearse niveles más bajos, tales como de 1-10 µg. Por ejemplo, en el tejido puede inyectarse una vacuna de ADN contra el VIH, por ejemplo, ADN desnudo o polinucleótido, en un vehículo acuoso, por ejemplo, por vía intramuscular o intradérmica, en cantidades de 10 µl por sitio a aproximadamente 1 ml por sitio. La concentración de polinucleótido en la formulación suele ser de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 4 mg/ml.
- La vacuna puede suministrarse en una solución fisiológicamente compatible, tal como PBS estéril en un volumen de, por ejemplo, un mililitro. Antes de suministrarlas, las vacunas también pueden liofilizarse. Como bien saben los expertos en la materia, la dosis puede ser proporcional al peso.
- Las composiciones incluidas en el régimen descrito en el presente documento, para inducir una respuesta inmunitaria, pueden administrarse solas, o pueden administrarse conjunta o secuencialmente con otras composiciones inmunológicas, antigénicas, de vacunas o terapéuticas.
- Las composiciones que también pueden administrarse con las vacunas incluyen otros agentes para potenciar o aumentar la respuesta inmunitaria, por ejemplo, IL-15, IL-12, IL-2 o ligando de CD40, que pueden administrarse a intervalos de tiempo específicos, o administrarse sin interrupción.
- Adicionalmente, para su suministro, las vacunas pueden formar complejos con otros componentes, tales como péptidos, polipéptidos e hidratos de carbono. Por ejemplo, vectores de expresión, es decir, vectores de ácido nucleico que no están contenidos dentro de una partícula vírica, pueden formar complejos con partículas o perlas que pueden administrarse a un individuo, por ejemplo, utilizando una pistola de vacunación.
- Las vacunas de ácido nucleico se administran mediante métodos muy conocidos en la técnica como los descritos en Donnelly et al. (Ann. Rev. Immunol. 15:617-648 (1997)); Felgner et al. (patente de Estados Unidos n.º 5.580.859,

publicada el 3 de diciembre de 1996); Felgner (patente de Estados Unidos n.º 5.703.055, publicada el 30 de diciembre de 1997); y Carson et al. (patente de Estados Unidos n.º 5.679.647, publicada el 21 de octubre de 1997). Un experto en la materia sabría que la elección de un vehículo farmacéuticamente aceptable, incluyendo un compuesto fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de la vía de administración del vector de expresión.

5 Como se ha señalado anteriormente, las composiciones de ADN inmunogénico pueden suministrarse a través de diversas vías. Las vías de suministro habituales incluyen la administración parenteral, por ejemplo, la vía intradérmica, intramuscular o subcutánea. La administración de los vectores de expresión descritos en el presente documento al músculo y por electroporación, puede ser un método de administración particularmente eficaz, que incluye inyecciones intradérmicas y subcutáneas y la administración transdérmica. La administración transdérmica, tal como por iontoforesis, es también un método eficaz para suministrar al músculo los vectores de expresión de la invención. También puede emplearse la administración epidérmica de los vectores de expresión de la invención. La administración epidérmica implica la irritación mecánica o química de la capa más externa de la epidermis para estimular una respuesta inmunitaria contra el irritante (Carson et al., patente de Estados Unidos n.º 5.679.647).

15 Las composiciones inmunogénicas también pueden formularse para la administración a través de las fosas nasales. Las formulaciones adecuadas para la administración nasal, en las que el vehículo es un sólido, incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 micrómetros que se administra de la manera en la que se toma el rapé, es decir, mediante inhalación rápida a través de las fosas nasales a partir de un envase con el polvo sujetado cerca de la nariz. Las formulaciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido para la administración, tal como, por ejemplo, un aerosol nasal, gotas nasales, o por administración de un aerosol mediante un nebulizador, incluyen soluciones acuosas u oleaginosas del principio activo. Para argumentos adicionales sobre la administración nasal de vacunas relacionadas con el SIDA, se hace referencia a las siguientes patentes, US 5.846.978, 5.663.169, 5.578.597, 5.502.060, 5.476.874, 5.413.999, 5.308.854, 5.192.668 y 5.187.074.

Las vacunas pueden incorporarse, si se desea, en liposomas, microesferas o en otras matrices poliméricas (véase, por ejemplo, Felgner et al., patente de Estados Unidos n.º 5.703.055; Gregoriadis, Liposome Technology, Vóls. I a III (2ª ed. 1993)). Los liposomas, por ejemplo, que consisten en fosfolípidos u otros lípidos, son vehículos no tóxicos, fisiológicamente aceptables y metabolizables, que son relativamente sencillos de preparar y de administrar. Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersiones fosfolipídicas, capas laminares y similares.

### 35 Ejemplos que ilustran la invención

Ejemplo 1. La vacunación con ADN de nucleocápside induce respuestas inmunitarias celulares cruzadas específicas de clados en ratones

#### 40 Resultados

##### *Vacunas de ADN de elementos conservados*

Se identificó un conjunto de elementos conservados (CE) en p24<sup>gag</sup> compuesto de aminoácidos (AA) muy conservados en todo el grupo M del VIH-1, según lo determinado utilizando la base de datos de VIH de Los Alamos (sitio en la red [www.hiv.lanl.gov/](http://www.hiv.lanl.gov/)) [32]. Se seleccionó un listado excelente de 7 CE basándose en diversos criterios (Figura 1A, véase Materiales y Métodos): una longitud mínima de 8 AA; inclusión de epítomos específicos que se habían correlacionado con control vírico (bajas cargas víricas) *in vivo*; y exclusión de epítomos asociados a altas cargas víricas. El CE seleccionado abarca 12-24 aminoácidos cada uno y, en conjunto, un total de 124 AA, representando así el 54 % de la secuencia de p24<sup>gag</sup>. Los CE se resaltan en la estructura de cinta de la cápside de p24<sup>gag</sup> [97], revelando que engloban la mayor parte de las regiones enrolladas extendidas de la proteína p24<sup>gag</sup> (Figura 1B).

Se generaron múltiples vacunas basadas en ADN en las que los 7 CE se dispusieron en forma colineal (Figura 1C) y se conectaron mediante secuencias enlazadoras cortas (Figura 1D), diseñadas para una escisión proteolítica eficaz [91, 92]. El procesamiento proteolítico *in vitro* de los péptidos de CE reveló la producción de epítomos óptimos o de epítomos óptimos ligeramente extendidos de 6 de los 7 segmentos de CE (S. Le Gall, en preparación). Por lo tanto, se espera que, después de la expresión, el inmunógeno de CE pueda presentar un número significativo de epítomos de linfocitos T nativos. Para una disposición óptima de los diferentes segmentos dentro de los inmunógenos de p24CE, se tuvo en cuenta la hidrofobicidad del CE individual (Figura 1C). Para evitar el extremo N fuertemente hidrófobo en la disposición CE1-2-3-4-5-6-7 (panel izquierdo), lo que podría influir en el tránsito intracelular de la proteína, el péptido CE1 se colocó en el extremo C (panel derecho).

La mayoría de los AA incluidos en los inmunógenos de p24CE son esencialmente invariables, ya que se encuentran en > 98 % de los aislados del VIH. La longitud de p24CE se expandió al incluir algunos AA menos conservados (sitios 'alternos'), expresando de este modo regiones adicionales posiblemente inmunogénicas. Esto permitió la extensión del CE 7 a la longitud de 12-24 AA, como se mencionó anteriormente, y condujo a dos secuencias de p24CE que diferían en 7 AA, una en cada CE (Figura 1A), denominadas p24CE1 y p24CE2. Estas dos secuencias cubren >99 %

de todas las secuencias conocidas del grupo M del VIH-1. Las secuencias de p24CE1 y p24CE2 se optimizaron con ARN/codones [73-75] para maximizar el procesamiento, el transporte y la estabilidad y traducción de ARNm (véase Materiales y Métodos). Las regiones codificantes de p24CE se clonaron en el vector de vacuna pCMVkan (p24CE; Figura 1D). Para modificar el tránsito y el procesamiento intracelular de las proteínas p24CE, se generaron plásmidos de expresión adicionales. Los plásmidos PS-p24CE1 y PS-p24CE2 contienen el péptido señal de GM-CSF en el extremo N de p24CE para promover la secreción de las proteínas p24CE. Los plásmidos MCP3-p24CE1 y MCP3-p24CE2 expresan proteínas de fusión con la quimiocina proteína 3 quimioatrayente de monocitos (MCP-3), que anteriormente se demostró que estabilizaba la proteína codificada y que mejoraba el tránsito a las células presentadoras de antígeno [80,81]. Los plásmidos LAMP-p24CE1 y LAMP-p24CE2 expresan proteínas de fusión con la proteína de membrana 1 humana asociada al lisosoma (LAMP-1). Se demostró previamente que la fusión de Gag con LAMP la dirige al compartimento lisosomal y facilita el acceso a la ruta del MHC de clase II, así como al compartimento extracelular [98-102].

#### *Expresión de las proteínas p24CE en células humanas*

La expresión de los vectores p24CE mostrada en la Figura 1D se evaluó mediante inmunotransferencias de Western utilizando extractos celulares y sobrenadantes de células HEK293 transfectadas de manera transitoria (Figura 2). Para controlar la misma carga, la membrana que contenía las muestras asociadas a las células se exploró con un anticuerpo contra la beta actina humana como control interno (panel central), lo que demostraba que en cada carril se cargaron cantidades similares de proteínas, lo que validaba nuestras conclusiones con respecto a la estabilidad y a la distribución diferente de las proteínas codificadas por los diferentes plásmidos transfectados (véase más adelante). Se detectaron niveles muy bajos de las proteínas p24CE1 y p24CE2 en las fracciones asociadas a las células (carriles 1 y 5, respectivamente), y no se encontraron proteínas en el compartimento extracelular, lo que indica que las proteínas p24CE eran inestables. También se observó que la proteína p24CE2, que solo se diferenciaba de la proteína p24CE1 en 7 de los 124 AA, producía un antígeno aún menos estable. La presencia del péptido señal (PS) GM-CSF aumentó considerablemente los niveles de ambas proteínas p24CE (carriles 2 y 6) tanto en las fracciones asociadas a las células como en las fracciones extracelulares. Estos datos indican que el péptido señal modificó el tránsito de las proteínas p24CE y promovió el aumento de la estabilidad y la secreción. Destacó la presencia de bandas adicionales de las proteínas p24CE secretadas, probablemente debido a modificaciones postraduccionales relacionadas con el tránsito celular modificado (compárense los carriles 2 y 1; y los carriles 6 a 5). Las proteínas de fusión MCP3-p24CE (carriles 3 y 7) y LAMP-p24CE (carriles 4 y 8) también pudieron detectarse fácilmente, y por lo tanto, estas fusiones estabilizaron considerablemente las proteínas p24CE. La localización de MCP3-p24CE en la fracción extracelular (carriles 3 y 7) como varias bandas, fue similar a nuestro informe anterior sobre una proteína de fusión MCP3-Gag [81]. Las proteínas LAMP-p24CE se acumularon principalmente en la fracción asociada a células (carriles 4 y 8), aunque también pudo encontrarse alguna proteína en la fracción extracelular, como se observó anteriormente en la proteína LAMP-p55gag [101]. Estos datos mostraron que modificando el tránsito de las proteínas p24CE, añadiendo el péptido señal GM-CSF o después de la fusión a las moléculas MCP3 o LAMP, mejoraba la estabilidad y se modulaba el tránsito de las proteínas p24CE.

#### *La vacunación con p24CE induce respuestas inmunitarias celulares específicas de CE en ratones C57BL/6*

A continuación, evaluamos la inmunogenicidad de diferentes proteínas p24CE después de la vacunación con ADN de ratones C57BL/6. Se vacunaron grupos de ratones (N=5) dos veces (0 y 4 semanas) con los plásmidos p24CE indicados o con ADN plasmídico simulado, como control negativo, por inyección intramuscular seguido de electroporación (EP) *in vivo*. Dos semanas después de la última vacunación (semana 6), se sacrificaron los ratones y se determinó la presencia de respuestas celulares específicas de CE mediante citometría de flujo policromática. Los esplenocitos de los animales individuales de cada uno de los grupos de vacunas y del grupo de control negativo inoculado con ADN simulado, se estimularon con un conjunto de péptidos de Gag de consenso del Grupo M (péptidos de 15 oligómeros que se solapan en 11 AA) (Figura 3A) o con un conjunto de péptidos de COT-M (10 oligómeros que se solapan en 9 AA) que consta de las secuencias de p24CE1 y p24CE2 (Figura 3B). El uso del conjunto de péptidos de 15 oligómeros permitió detectar respuestas de linfocitos T tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, mientras que el conjunto de péptidos de 10 oligómeros favorece principalmente respuestas de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. La vacunación con plásmidos que expresan p24CE o las proteínas secretadas p24CE (PS-p24CE) indujo respuestas inmunitarias de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas de CE (Figura 3A). Por el contrario, la vacunación con las proteínas de fusión p24CE, MCP3-p24CE o LAMP-p24CE, suscitó respuestas específicas de CE que estaban casi exclusivamente mediadas por linfocitos T CD4<sup>+</sup>. De conformidad con estos resultados, la estimulación de esplenocitos con conjuntos de péptidos de 10 oligómeros, que están principalmente asociados a antígenos de MHC de clase I, indujo respuestas muy bajas en ratones vacunados con ADN de MCP3-p24CE y ninguna respuesta en ratones inmunizados con LAMP-p24CE, que verificó las conclusiones anteriores (Figura 3B). Nuestra hipótesis es que el tránsito intracelular modificado de los antígenos de fusión p24CE podría ser responsable de la clara preferencia por las respuestas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>. Las respuestas suscitadas por las proteínas p24CE1 fueron en general más altas que las inducidas por p24CE2 (Figura 3A y 3B, tenga en cuenta las diferentes escalas de p24CE1 y p24CE2), probablemente reflejando la mayor expresión de p24CE como se indica en los experimentos de transfección transitoria (véase la Figura 2). Como se esperaba, en los esplenocitos de ratones vacunados con ADN simulado no se encontraron respuestas celulares.

La reactividad cruzada de las respuestas inducidas se analizó utilizando conjuntos de péptidos que representaban

diferentes clados del VIH-1 (A, B y C; véase también la Figura 1A). La vacunación con ADN de PS-p24CE1 indujo respuestas celulares de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con reactividad cruzada a clados, que fueron similares en magnitud a las obtenidas con el conjunto de péptidos del Grupo M (Figura 3C). También se obtuvo reactividad cruzada a clados después de la vacunación con los otros plásmidos p24CE (datos no mostrados). Por el contrario, los esplenocitos de ratones inmunizados con ADN simulado no pudieron reconocer los péptidos de ninguno de los tres conjuntos de péptidos específicos de clado.

*Especificidad excelente de respuestas de linfocitos T específicos de CE de ratones C57BL/6 vacunados*

A continuación, se evaluó la distribución de las respuestas celulares inducidas por p24CE entre los diferentes CE (Figura 4). Se estimularon esplenocitos agrupados de los ratones C57BL/6 vacunados con ADN (N = 5 / grupo) con grupos de péptidos de consenso del Grupo M (15 oligómeros) que engloban los 7 CE individuales. Se utilizó citometría de flujo policromática para determinar la frecuencia de los linfocitos T productores de IFN- $\gamma$  específicos de CE y para discriminar entre las respuestas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. La inmunización con los diferentes plásmidos p24CE1 (paneles de la izquierda) y p24CE2 (paneles de la derecha) indujo respuestas celulares contra CE1 y CE6, que fueron mediadas casi exclusivamente por linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Curiosamente, los ratones inmunizados con plásmidos que codifican la proteína p24CE nativa (p24CE y PS-p24CE) también desarrollaron respuestas celulares altas mediadas por CD8<sup>+</sup> contra CE2. Estos datos coinciden con la localización celular de las proteínas codificadas: la proteína p24CE nativa permanece principalmente intracelular, mientras que las fusiones PS-p24CE y MCP3-p24CE se secretan activamente y la fusión LAMP-p24CE se asocia con el compartimiento del MHC de clase II. También se identificaron niveles bajos de respuestas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> contra CE3 después de la inmunización con la proteína p24CE y los plásmidos MCP3-p24CE. En conclusión, las proteínas p24CE indujeron respuestas contra 4 de los 7 CE (CE1, CE2, CE3 y CE6) en los ratones, aunque estas respuestas fueron generalmente más bajas en los animales inmunizados con los plásmidos p24CE2, lo que demuestra que la vacunación indujo respuestas amplias de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

*p24CE induce respuestas inmunitarias más amplias que p55gag de longitud completa*

Comparamos las respuestas inmunitarias contra el CE individual después de la vacunación con un ADN plasmídico p55<sup>gag</sup> o con una mezcla de ADN de PS-p24CE1 y PS-p24CE2. Los ratones (N=5/grupo) recibieron 3 vacunaciones (semanas 0, 3 y 6) y se sacrificaron en la semana 8 (Figura 5A). Las respuestas de los linfocitos T inducidas por la vacuna se analizaron a partir de esplenocitos agrupados (Figura 5B) estimulados con conjuntos de péptidos de 15 oligómeros específicos para p24<sup>gag</sup> de clado A, B o C (panel de la izquierda) y el consenso del grupo M (panel de la derecha). Las respuestas globales inducidas por el inmunógeno p55<sup>gag</sup> fueron más bajas que las obtenidas por el inmunógeno p24CE, y notablemente, carecían de linfocitos T específicos de CD8<sup>+</sup>. El uso de conjuntos de péptidos que abarcan el CE individual (Figura 5C) mostró que el ADN de p55<sup>gag</sup> suscitaba respuestas bajas solamente contra CE1 y CE6 (panel de la derecha), mediada exclusivamente por linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Por el contrario, la vacunación con la mezcla de ADN de PS-p24CE suscitó respuestas más altas hacia varios CE (CE1, CE2 CE3 y CE6), como también se espera de los datos mostrados en la Figura 4.

También evaluamos la calidad de las respuestas inmunitarias celulares suscitadas por los diferentes inmunógenos (Figura 5D) utilizando el conjunto de péptidos p24<sup>gag</sup> seguido de tinción intracelular de citocinas y citometría de flujo policromática. La vacunación con ADN de p55<sup>gag</sup> indujo principalmente respuestas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (rojo), mientras que la vacunación con p24CE indujo respuestas de linfocitos T tanto CD4<sup>+</sup> (rojo) (CE1 y CE6) como CD8<sup>+</sup> (negro) (CE2 y CE3) (Figuras 5B y 5C, panel superior). Ambos inmunógenos indujeron linfocitos T de memoria efectora (CD44<sup>hi</sup> y CD62L<sup>neg</sup>) (Figura 5C, panel central), que fueron principalmente CD4<sup>+</sup> (0,28 % del total de linfocitos T) en ratones vacunados con ADN de p55<sup>gag</sup>, y tanto CD4<sup>+</sup> (0,72 % del total de linfocitos T) como CD8<sup>+</sup> (0,37 % del total de linfocitos T) en ratones vacunados con el ADN de PS-p24CE. Análisis adicionales revelaron que los linfocitos T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> específicos de antígeno, produjeron TNF- $\alpha$  y expresaron CD107a en la superficie después de la estimulación con antígeno, lo que indicaba la inducción de linfocitos T citotóxicos (Figura 5D, panel inferior). También se observó que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (negro), inducidos solo por la vacunación con ADN de PS-p24CE, expresaron niveles más altos de CD107a y niveles más bajos de TNF $\alpha$  que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (rojo), un fenotipo acorde con la desgranulación asociada a la actividad de CTL. En conjunto, nuestros resultados muestran que la vacuna de p24CE aumentó la amplitud y la magnitud de las respuestas celulares contra la región de p24<sup>gag</sup> en ratones vacunados con ADN, al inducir respuestas contundentes contra varios de los elementos muy conservados, y que las respuestas son multifuncionales, una característica deseada para una vacuna eficaz contra el VIH.

*La vacunación con p24CE induce respuestas inmunitarias humerales con reactividad cruzada a clados*

A continuación, examinamos la inducción de respuestas inmunitarias humerales utilizando muestras de plasma agrupadas de ratones vacunados con ADN de p24CE (N=5/grupo) mediante un ELISA que mide respuestas de p24<sup>gag</sup> del clado B (Figura 6A). Los diferentes antígenos de p24CE indujeron fácilmente altos niveles de respuestas humerales con títulos similares o superiores a los obtenidos en ratones vacunados con ADN de p55<sup>gag</sup> (excepto p24CE2, panel central). La vacunación con ADN de p24CE indujo anticuerpos contra las proteínas p24CE (Figura 6B, panel superior, carriles 2 y 3) así como contra la proteína p24<sup>gag</sup> procesada (carril 1). Por el contrario, los anticuerpos inducidos por la vacunación con ADN de p55<sup>gag</sup> detectaron fácilmente a la proteína p24<sup>gag</sup> (Figura 6B, panel inferior, carril 1), pero no

podieron reconocer a las proteínas p24CE (carriles 2 y 3). Por tanto, de manera similar a las respuestas inmunitarias celulares (véase la Figura 5), los anticuerpos suscitados después de la vacunación con ADN de p55<sup>gag</sup> de longitud completa, no pudieron reconocer los elementos conservados.

- 5 También examinamos la reactividad cruzada a clados de estas respuestas mediante análisis de inmunotransferencia de Western (Figura 6C). Las membranas que contenían las proteínas p55<sup>gag</sup> de los clados A y C de consenso, clado B (HXB2) y COT-M, obtenidas de células transfectadas de manera transitoria, se exploraron con muestras de plasma agrupadas de ratones vacunados con plásmidos que expresaban PS-p24CE1, PS-p24CE2 o p55<sup>gag</sup>. Los análisis de inmunotransferencia de Western mostraron que los anticuerpos inducidos por los ratones vacunados con ADN de p24CE y p55<sup>gag</sup> detectaban las diferentes proteínas p55<sup>gag</sup>. Estos datos sugieren que, de manera similar a p55<sup>gag</sup>, los ratones vacunados con p24CE, indujeron anticuerpos con reactividad cruzada a clados.

- En conjunto, estos datos muestran que la vacunación con ADN de p24CE indujo fuertes respuestas inmunitarias humorales (Figura 6) y celulares (Figura 4) contra a los elementos muy conservados en p24<sup>gag</sup>, y que los segmentos de CE no son o son poco inmunogénicos cuando se expresan como parte de la proteína p55<sup>gag</sup> completa en ratones C57BL/6 vacunados con ADN.

### Argumento

- 20 Los experimentos realizados en ratones demostraron que puede producirse una vacuna de ADN que exprese 7 elementos muy conservados seleccionados dentro de p24<sup>gag</sup> del VIH-1 y que esta vacuna de ADN es inmunogénica en comparación con la p55<sup>gag</sup> nativa de longitud completa codificada por el ADN. Anteriormente, se demostró que los individuos con infección crónica por VIH-1 desarrollaban respuestas inmunitarias celulares específicas para los péptidos codificados por los 7 elementos conservados descritos en este trabajo [34]. Asimismo, encontramos que la amplitud, la magnitud y la avidéz de estas respuestas celulares a algunos CE fueron significativamente más altas entre los pacientes que eran capaces de controlar la infección por VIH-1, lo que sugiere que las respuestas contra estas regiones conservadas son clínicamente relevantes [34].

- 30 Partiendo de nuestro entendimiento acerca de las reglas para la expresión contundente de genes y para evitar el potencial de escape del VIH, construimos vectores de ADN optimizados que expresaban niveles máximos de nuevos inmunógenos artificiales basados en elementos muy conservados de la región p24<sup>gag</sup>. Este diseño de vacuna se basó en dos principios, (i) el inmunógeno debía incluir elementos críticos y muy conservados del virus que no podían mutar sin una pérdida grave de la viabilidad, y (ii) el inmunógeno debía excluir los epitopos del VIH que fuesen capaces de mutar sin afectar significativamente a la capacidad replicativa del virus. El primero puede inducir respuestas contra un gran número de aislados del VIH, y el segundo evita la competencia inmunodominante de regiones variables, lo que puede hacer que la respuesta inmunitaria inducida por la vacuna sea ineficaz. No solo se optimizó la expresión, sino también la estabilidad y presentación de los antígenos artificiales codificados por los vectores de ADN. Para esta finalidad, se diseñaron diferentes construcciones de fusión. Anteriormente, observamos que la adición de un péptido señal o la fusión con MCP3 o LAMP eran beneficiosas para la expresión de las proteínas [81,80,94], y encontramos que estas modificaciones también estabilizan las proteínas p24CE.

- 45 Para maximizar la estimulación de los linfocitos CD4<sup>+</sup>, además de la de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, diseñamos inmunógenos segregados. El antígeno p24CE unido al péptido señal de GM-CSF se expresó a niveles altos y también produjo linfocitos T específicos de antígeno tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, así como buenos títulos de anticuerpos. Por el contrario, las proteínas p24CE fusionadas con MCP-3 o LAMP dirigieron el desarrollo de la mayoría de las respuestas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Estos estudios muestran que es posible manipular muchas propiedades de un antígeno, modificando la respuesta inmunitaria de manera predecible. Aunque las respuestas de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> se han relacionado con el control de la viremia, también hemos informado que las respuestas de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> citotóxicos contribuyen al control vírico [103]. La vacuna de p24CE indujo respuestas de linfocitos T específicas tanto para CD4<sup>+</sup> (CE1 y CE6) como para CD8<sup>+</sup> (CE2 y CE3) en ratones C57BL/6; estos linfocitos T CD8<sup>+</sup> tenían el fenotipo funcional de CTL maduros y no estaban presentes en ratones inmunizados con el ADN que codifica a p55<sup>gag</sup>. Las moléculas generadas permiten la selección de las combinaciones más óptimas para obtener la mejor respuesta protectora para la profilaxis del VIH. Hemos encontrado que las proteínas p24CE son más inmunogénicas que la proteína Gag de longitud completa, expandiendo la calidad de las respuestas celulares para reunir linfocitos T CD8<sup>+</sup> con las propiedades funcionales de los CTL canónicos en ratones C57BL/6. Estos hallazgos sugieren que los linfocitos T no reconocieron de manera eficaz a los péptidos que contenían las regiones de elementos conservados (CE) producidas a partir del antígeno p55<sup>gag</sup> de longitud completa. Esto podría deberse a un mal procesamiento antigénico o a una mala presentación del antígeno, o como alternativa, a la interferencia por péptidos inmunodominantes de otras regiones dentro de p55<sup>gag</sup>, que son capaces de desviar o inhibir la respuesta inmunitaria. Además, como se muestra en las Figuras 3 y 4, el tránsito de la proteína afectó considerablemente a su inmunogenicidad, suscitando p24CE y SP-p24CE las respuestas más altas y más equilibradas de CD4 y CD8. La selección de la proteína p24CE más óptima indujo una inmunogenicidad más alta y más amplia que p55<sup>gag</sup>. Recientemente, también hemos demostrado que las células dendríticas cargadas *in vitro* con ARN que codifica la proteína p24CE descrito en este trabajo, podían estimular respuestas de linfocitos T cuando se mezclaban con PBMC autólogas de pacientes con VIH o podían inducir respuestas de linfocitos T *de novo* en las PBMC de donantes sanos. Las respuestas suscitadas por p24CE fueron generalmente tan altas como las de Gag [33].

Todos los estudios de inmunogenicidad descritos en el presente trabajo se realizaron en ratones C57BL/6. Desde la experiencia de autores de la presente invención, la inmunización con ADN de p55<sup>gag</sup> utilizando el modelo de ratón Balb/c induce respuestas más altas de linfocitos T, pero esas respuestas están dirigidas casi exclusivamente hacia un único epítipo inmunodominante, AMQMLKETI, que está presente en nuestra construcción p24CE. Por lo tanto, para evitar las restricciones impuestas por este repertorio limitado, elegimos el modelo de ratón C57BL/6 para el trabajo descrito en el este documento. Encontramos respuestas inmunitarias primarias muy bajas en las regiones de CE después de la vacunación con ADN utilizando p55<sup>gag</sup> de longitud completa. Será interesante examinar más a fondo si otras modalidades de vacuna, es decir, vectores víricos recombinantes, que expresan p55<sup>gag</sup>, son capaces de inducir respuestas inmunitarias superiores a las de los elementos conservados. Hasta donde alcanza el conocimiento de los inventores, este estudio es la primera evaluación comparativa de la inmunidad inducida por un inmunógeno de longitud completa y la inducida por elementos muy conservados dentro de la misma proteína. Nuestro análisis apunta al efecto negativo de las regiones fuera de los elementos conservados definidos, que, es importante tener en cuenta, están presentes en el tipo silvestre de longitud completa, así como en las moléculas de consenso y en mosaico, así como en los inmunógenos de epítipo a los que se hace referencia. Por tanto, el uso de la plataforma de elementos muy conservados ofrece la ventaja de enfocar las respuestas inmunitarias a los epítopos invariables presentes en el proteoma vírico. De manera similar al trabajo descrito en el presente documento, anteriormente Letourneau et al. [11] demostraron que una proteína quimérica que contenía una cadena de varias regiones invariables del proteoma del VIH-1 era inmunogénica, pero no se realizó ninguna comparación directa con las mismas secuencias expresadas dentro de las proteínas naturales. En nuestro estudio, aplicamos criterios más estrictos para definir los elementos conservados que dan como resultado secuencias peptídicas más cortas (12-24 AA) que excluyen segmentos adyacentes más variables. Además, nuestro análisis de las respuestas inmunitarias se realizó utilizando, como inmunógenos, conjuntos de péptidos estrictamente confinados en los segmentos conservados definidos y, por lo tanto, la contribución a las respuestas de los linfocitos T de supuestos nuevos epítopos artificiales creados por los límites fue completamente excluida. En conclusión, demostramos que en los ratones vacunados, la vacuna con ADN de p24CE indujo amplias respuestas celulares y humorales con reactividad cruzada a clados. Se detectaron respuestas inmunitarias contundentes, incluyendo linfocitos T CD8<sup>+</sup>, contra varios CE después de la vacunación con ADN de p24CE ADN en ratones, mientras que solo se obtuvieron respuestas muy malas (solo CD4<sup>+</sup>) o ninguna respuesta contra los CE mediante la vacunación de ADN con vectores que expresan la proteína p55<sup>gag</sup> de longitud completa. Por tanto, la inclusión de vectores de ADN que expresan los elementos conservados es una táctica de vacuna prometedora para inducir una inmunidad más amplia en comparación con la vacunación con el ADN de p55<sup>gag</sup> solo. Estos resultados sugieren una evaluación adicional de los antígenos de p24CE en macacos.

## Materiales y métodos

### *Selección de elementos conservados de p24<sup>gag</sup>*

Utilizando todas las secuencias codificantes de p24<sup>gag</sup> del grupo M del VIH-1 disponibles en la base de datos de Los Álamos de 2009, se identificaron secuencias de al menos 8 AA de longitud, en las que todos los AA se conservaron en al menos el 98 % de todas las secuencias. Después, este requisito se suavizó de dos maneras: En primer lugar, utilizando datos disponibles que correlacionaban el reconocimiento de epítopos con la carga vírica clínica, se intentó incluir epítopos completos que se asociaron con una carga vírica baja y excluir epítopos que se asociaron con una carga vírica alta. En segundo lugar, se permitió 1 sitio alterno (variable)/segmento CE si los 2 AA más comunes en ese sitio se encontraban juntos en > 99 % de todas las secuencias conocidas [32]. Para incorporar esta variación, se crearon dos plásmidos, cada uno con 7 segmentos CE de 12-24 AA de longitud, separados por 2-4 AA espaciadores (por lo general, Ala-Ala-X) y diferenciándose solo por el único AA alterno. La longitud y la secuencia de los espaciadores se establecieron en función del conocimiento existente sobre especificidades de escisión y disponibilidad de péptidos [104], así como para evitar homologías de unión fortuitas con el VIH y el proteoma humano, determinándose esto último a través de la búsqueda contra las bases de datos de secuencias de proteínas humanas y del VIH.

### *Plásmidos de ADN*

Las secuencias codificantes de los genes *p24CE* y *gag* se diseñaron mediante optimización de ARN/codones para una expresión eficaz en células de mamífero [73-75] y se sintetizaron químicamente (GeneArt, Life Technologies, Grand Island, NY). Los genes se clonaron en el vector pCMVkan [81] optimizado para alta expresión génica. pCMVkan contiene el promotor de citomegalovirus humano, y los transcritos expresados contienen un entorno óptimo para el codón iniciador AUG de la proteína *tat* del VIH-1 que impide el inicio de la traducción de los AUG internos [105], el sitio de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino (BGH, *bovine growth hormone*) y el gen de resistencia a kanamicina. Este vector no contiene ningún sitio de corte y empalme o intrones. Las proteínas p24CE1 y p24CE2 se produjeron a partir de vectores independientes (plásmidos 164H y 182H, respectivamente). Las formas secretadas PS-p24CE1 y PS-p24CE2 contienen el péptido señal de GM-CSF (1-17 AA; número de registro NP\_000749 del Genbank) en el extremo N (plásmidos 234H y 235H). Los plásmidos MCP3-p24CE1 y MCP3-p24CE2 (plásmidos 167H y 201H) son proteínas de fusión con la proteína 3 quimioatrayente de monocitos (MCP-3) [80-81]. Los plásmidos LAMP-p24CE1 y LAMP-p24CE2 (plásmidos 191H y 202H) son proteínas de fusión con la proteína de membrana 1 asociada al lisosoma (LAMP-1) [98-101]. Se produjeron proteínas p55<sup>gag</sup> de longitud completa a partir de genes de ARN/optimizados con codones clonados en el plásmido pCMVkan, que expresa Gag del clado A (plásmido 187H,

número de registro AAQ98129 del Genbank), del clado B (plásmidos 114H, HXB2, número de registro AAB50258 del Genbank), del clado C (plásmido 160H, número de registro AAD12096 del Genbank ) y el centro de árbol COT (del inglés *center-of-tree*)-M (222H) [106]. Para las inmunizaciones se utilizó p55<sup>gag</sup> de HXB2. Los ADN exentos de endotoxina se prepararon utilizando el kit de Qiagen según el protocolo del fabricante (Qiagen, Valencia, CA)

5

#### *Transfección y análisis de proteínas*

Los plásmidos de ADN se transfectaron en  $1 \times 10^6$  células HEK-293 utilizando la técnica de co-precipitación con fosfato de calcio. Los sobrenadantes de cultivo y las células se recogieron 24 o 48 horas más tarde, y la expresión de la proteína se visualizó mediante análisis de inmunotransferencia de Western. Las proteínas se resolvieron en geles Bis-Tris de NuPAGE al 10 % o al 12 % (Invitrogen, Carlsbad, CA), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Invitrogen), que se exploraron con un anticuerpo de cabra anti p24<sup>gag</sup> (dilución 1: 3.000, proporcionado por L. Arthur, SAIC, NCI, Frederick) seguido de anticuerpo anti IgG de cabra marcado con HRP (dilución 1:10.000; Calbiochem, EMD chemicals, Gibbstown, NJ) o con plasma (dilución 1: 200) de ratones vacunados con ADN seguido de anticuerpo anti IgG de ratón marcado con HRP (dilución 1: 10.000, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Como control, las membranas se exploraron con anticuerpo anti pan actina de ser humano (clon C4, EMD Millipore, Billerica, MA) a una dilución de 1:10.000. Las bandas se visualizaron utilizando el sistema de detección de quimioluminiscencia mejorada (ECL) y transferencia de Western (GE HealthCare, Piscataway, NJ).

10

15

#### *Estudios de vacunación de ADN en ratones*

Se obtuvieron ratones hembra C57BL/6N (de 6 a 8 semanas de vida) en Charles River Laboratories, Inc. (Frederick, MD) y se alojaron en el National Cancer Institute, Frederick, MD, en una instalación con temperatura y ciclo de luz controlados. Los ratones se inmunizaron con 20 µg de los ADN de la vacuna mediante inyección intramuscular seguido de electroporación *in vivo* mediante el dispositivo de electroporación de corriente constante ELGEN® (Inovio Pharmaceuticals, Inc, Blue Bell, PA). Como controles negativos, un grupo de ratones recibió la misma cantidad de ADN simulado siguiendo el mismo protocolo de inmunización. Los animales se vacunaron dos (0 y 4 semanas) o tres veces (0, 3 y 6 semanas), y se sacrificaron 2 semanas después de la última vacunación cuando se extrajeron los bazo y la sangre para el análisis de las respuestas celulares y humorales.

25

30

#### *Tinción intracelular de citocinas*

La frecuencia de linfocitos T productores de citocina<sup>+</sup> específicos de antígeno, se midió utilizando citometría de flujo policromática, como se ha descrito anteriormente[80]. Para estimular las respuestas celulares inducidas por la vacuna se utilizó el siguiente grupo de conjuntos de péptidos de Gag de 15 oligómeros, que se solapan en 11 AA: VIH-1 consenso de clado A (Cat n.º 8116), consenso de clado C (Cat n.º 8118) y consenso del Grupo M (Cat n.º 11057), obtenidos del Programa AIDS Research and Reference Reagent (Germantown, MD); Gag de 15 oligómeros de HXB2/Clado B (Infinity Biotech Research & Resource, Inc, Aston, PA). Se generaron conjuntos de péptidos que abarcaban p55<sup>gag</sup>, p24<sup>gag</sup> o solo CE. Además, utilizamos conjuntos de péptidos de 10 oligómeros que se solapaban en 9 AA desde el COT-M que abarcaba los CE1-CE7 individuales, sin incluir las secuencias enlazadoras, de p24CE1 y p24CE2 (instalación de síntesis de péptidos del Hospital General de Massachusetts, Boston). Los esplenocitos se cultivaron a 37 °C y con CO<sub>2</sub> al 5 % a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI-1640 completo que contenía grupos de péptidos Gag a una concentración final de 1 µg/ml de cada péptido. En todos los experimentos, se utilizaron esplenocitos cultivados en medio sin conjuntos de péptidos o estimulados con forbol miristato acetato (PMA, *phorbol myristate acetate*) e ionóforo de calcio (Sigma, St.Louis, MO) como control negativo y positivo, respectivamente. La secreción de proteínas se bloqueó mediante la adición de monensina (GolgiStop, BD Biosciences) 1 hora después de la estimulación. Después de 12 horas de incubación, las células se recogieron y la tinción de la superficie celular se realizó utilizando el siguiente cóctel de anticuerpos: CD3- APCCy7, CD4-PerCP y CD8-Azul Pacífico (BD Pharmingen, San Diego, CA). Los esplenocitos se lavaron dos veces, se fijaron, se permeabilizaron con Cytotfix / Cytoperm (BD Pharmingen) y para la detección intracelular de citocinas se realizó tinción utilizando IFN-γ-FITC (BD Pharmingen). En otro conjunto de experimentos, el cóctel de anticuerpos para la tinción de la superficie incluía: CD3-AF700, CD4-PerCP, CD8-Azul Pacífico, CD44-V500, CD62L-PE, CD107a-PE Cy7 (BD Pharmingen). Durante el cultivo de los esplenocitos con los péptidos se añadió anticuerpo anti CD107a. Para la tinción intracelular de citocinas se utilizó IFN-γ-APC y TNF-α-APC Cy7 (BD Pharmingen). Después de la tinción intracelular, las células se lavaron dos veces y las muestras se analizaron en un citómetro de flujo LSR II (BD Pharmingen). El análisis de los datos se realizó utilizando la plataforma FlowJo, (Tree Star, Inc., Ashland, OR). Todas las respuestas específicas de antígeno se dan después de restar los valores obtenidos de las muestras sin estimulación con péptidos. Solo los esplenocitos que dieron una respuesta más de dos veces mayor que la del valor de la muestra sin péptidos (solo medio) se consideraron positivos.

35

40

45

50

55

#### *Ensayos con anticuerpos*

Las diluciones en serie de las muestras de plasma se analizaron mediante ELISA estándar de p24<sup>gag</sup> del VIH-1 del clado B (Advanced Bioscience Lab, Rockville, MD), midiendo la absorbancia óptica a 450 nm.

#### 65 Ejemplo 2. La vacunación con ADN de nucleocápside induce respuestas inmunitarias celulares cruzadas específicas de clados en macacos

## Resultados

### 5 *La vacunación con ADN de gag induce respuestas inmunitarias celulares específicas de elementos conservados (CE) p24<sup>gag</sup> en macacos*

10 Primero se investigó si la vacunación de los macacos con un plásmido que expresaba p55<sup>gag</sup> era capaz de suscitar respuestas inmunitarias contra los 7 CE [32,34] identificados dentro de la secuencia de p24<sup>gag</sup> (Figura 7). Cuatro animales se vacunaron dos veces (0, 2 meses) con ADN de p55<sup>gag</sup> del COT-M mediante inyección IM seguido de electroporación (EP) *in vivo*. En el análisis se incluyeron siete animales previamente vacunados con un plásmido que expresaba la proteína p55<sup>gag</sup> de longitud completa suministrada por vía intramuscular (N=4) [82] o con un plásmido que expresaba la proteína p37<sup>gag</sup> suministrada mediante IM/EP (N=3) [67]. La inducción de respuestas específicas de Gag se evaluó después de la estimulación de PBMC con un conjunto de péptidos específico de p24<sup>gag</sup>, así como con un conjunto de péptidos específico de CE (véase Material y Métodos). Los 11 macacos desarrollaron respuestas fácilmente detectables en la región p24<sup>gag</sup>, sin embargo, solo 5 de los 11 macacos (45 %) desarrollaron respuestas contra CE (Figura 7B). A continuación, se analizó la especificidad de las respuestas hacia los elementos conservados individuales en los 5 macacos que mostraron reconocimiento del CE (Figura 7C). Se encontró que 3 macacos (L985, P574, R288) reconocieron solo 1 CE (CE3 o CE5), mientras que 2 macacos (R067 y M121) desarrollaron respuestas contra 2 CE (CE4, CE5 y CE5, CE6, respectivamente). Por otra parte, solo el animal L985 desarrolló respuestas significativas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> contra el CE, mientras que los 4 animales restantes mostraron respuestas mediadas casi exclusivamente por linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Estas respuestas de linfocitos T específicas de CE incluyeron linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> con potencial citotóxico, a juzgar por la presencia de linfocitos T productores de granzima B<sup>+</sup> específicos de antígeno en los 5 animales (Figura 7D).

25 La falta de reconocimiento de CE en la mayoría de los animales vacunados planteó la preocupación de que la inmunogenicidad de los epítomos de CE dentro de la proteína Gag puede estar deteriorada debido a un procesamiento y presentación subóptimos de los péptidos que contienen CE, o a la inmunodominancia ejercida por regiones variables dentro de Gag dirigiendo las respuestas de CTL lejos de CE.

### 30 *La vacunación con ADN de p24CE induce respuestas inmunitarias celulares en macacos*

Para analizar si en macacos podían suscitarse respuestas inmunitarias más amplias contra CE, los animales se vacunaron con una mezcla de los dos vectores de ADN p24CE que se diseñaron para expresar los 7 CE dispuestos colinealmente. (Véase el Ejemplo 1). Las dos proteínas diferían en 1 AA ('alterno') por CE, (PS-p24CE1 y PS-p24CE2) (Figura 7A). Se vacunaron cuatro animales dos veces (0, 2 meses) con ADN de p24CE utilizando suministro IM/EP. Las respuestas inmunitarias celulares se midieron en muestras de sangre recogidas 2 semanas después de la 2<sup>a</sup> vacunación (EP2sem2). También se incluyeron en este análisis dos macacos más (M437, P314), previamente inmunizados con plásmidos p24CE. Los 6 macacos desarrollaron respuestas celulares específicas de CE (Figura 8A), medida por la producción de IFN- $\gamma$  con una frecuencia que variaba de 0,1 % a 0,6 % del total de linfocitos T. Los niveles de respuestas globales no fueron significativamente más bajos en comparación con los de los animales vacunados con ADN de p55<sup>gag</sup> (datos no mostrados). Estas respuestas incluyeron linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, aunque las respuestas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> fueron dominantes en 4 de los 6 animales vacunados (Figura 8A). Estos resultados contrastan con los obtenidos después de la vacunación con ADN de p55<sup>gag</sup>, donde solo 5 de 11 animales inmunizados desarrollaron respuestas contra CE, mediadas principalmente por linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 7). Utilizando animales exogámicos con diferentes haplotipos del MHC de clase I, el mapeo de las respuestas específicas de CE (Figura 8B) reveló el reconocimiento de todos los CE excepto el CE1 y CE7. La comparación de animales vacunados con ADN de p24CE o Gag muestra que no hubo ninguna correlación aparente entre el haplotipo y la capacidad para desarrollar respuestas contra CE, así pues, las diferencias podrían atribuirse al inmunógeno. Cinco de los 6 macacos vacunados con CE desarrollaron respuestas a 3 CE y solo un animal (M437) mostró respuestas a 1 CE. El análisis fenotípico de los linfocitos T específicos de antígeno, reveló memoria tanto central (CD28<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup>) como efectora (CD28<sup>-</sup>CD95<sup>+</sup>) (Figura 8C, paneles superiores). Un subconjunto de linfocitos T productores de IFN- $\gamma$ + específicos de CE también expresaron granzima B, lo que indica un fenotipo citotóxico (Figura 8C, paneles inferiores), suscitando por tanto respuestas citotóxicas específicas de CE. Estos resultados indican que, de manera similar a nuestra observación de ratones vacunados (Ejemplo 1), los vectores de ADN con CE son inmunogénicos en los 6 macacos y la mayoría (5 de 7) de los CE fueron inmunogénicos. Estos datos también demuestran que los péptidos que contienen CE se procesan y presentan correctamente y sugieren que el hecho de no inducir respuestas específicas de CE de p55<sup>gag</sup> o p37<sup>gag</sup> es probablemente el resultado de la inmunodominancia ejercida por los epítomos ubicados en las regiones variables.

### 60 *La vacunación con ADN de p24CE induce niveles más amplios y más altos de respuestas de linfocitos T polifuncionales específicos de CE que la vacunación con ADN de p55<sup>gag</sup>*

Adicionalmente, diseccionamos la inmunogenicidad de CE comparando las respuestas celulares inducidas por la vacunación con ADN de p24CE y p55<sup>gag</sup>. En primer lugar, comparamos el número de CE reconocidos en los macacos vacunados con ADN que expresaba las proteínas p24CE (N=6) o p55<sup>gag</sup> o p37<sup>gag</sup> de longitud completa (N=11) (Figura 9A). La inmunización con p24CE indujo respuestas significativas contra más CE (p = 0,0006; intervalo de 1-3 CE, mediana 3) que la vacunación con ADN de Gag (intervalo de 0-2 CE) (Figura 9A). Estos datos demuestran que el ADN

de p24CE indujo respuestas contra más CE, lo que indica una mayor amplitud de respuestas en comparación con la vacunación con el ADN de p55<sup>gag</sup>.

También comparamos la polifuncionalidad (producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CD107a y granzima B) de las respuestas de linfocitos T después de la estimulación con péptidos específicos de CE. La Figura 9B muestra la distribución de linfocitos T polifuncionales específicos de CE de macacos representativos que recibieron ADN de p24CE (panel superior) o ADN de p55<sup>gag</sup> (panel central). La proporción de linfocitos T polifuncionales (de 1 a 4 funciones) también se muestra como gráficos circulares (paneles de la derecha). Estos resultados demuestran que la vacunación con ADN de p24CE suscitó mayores niveles de linfocitos T citotóxicos específicos de CE que la vacunación con ADN de p55<sup>gag</sup>. La frecuencia de linfocitos T específicos de CE que secretan dos citocinas, que expresan granzima B y que son capaces de desgranularse después del reconocimiento del antígeno (función 4) también fue significativamente mayor ( $p = 0,03$ ) en macacos inmunizados con ADN de p24CE (panel inferior). En conjunto, estos datos muestran que el inmunógeno p24CE suscitó respuestas significativamente más altas, incluyendo a más CE, y que estas respuestas son multifuncionales y tienen propiedades citotóxicas.

#### *La vacunación con ADN de p55<sup>gag</sup> refuerza las respuestas de linfocitos T preexistentes específicos de CE*

Dado que la vacunación repetida con ADN de p55<sup>gag</sup> no produjo o solo produjo malas respuestas de linfocitos T específicos de CE *de novo* (Figura 7), investigamos si la vacunación con ADN de gag de longitud completa podría reforzar y/o ampliar la inmunidad preexistente específica de CE. Los macacos vacunados con p24CE recibieron una vacunación adicional con un plásmido que expresaba ADN de p55<sup>gag</sup> del COT-M (Figura 10A; grupo 1). Esto condujo a un aumento significativo ( $p = 0,002$ ) en las respuestas específicas de CE, alcanzando en algunos animales más del 1-2 % de la población total de linfocitos T (Figura 10B). El análisis de la polifuncionalidad de estas respuestas mostró que la frecuencia de los linfocitos T específicos de CE con 4 funciones también se reforzaba significativamente ( $p = 0,002$ ; Figura 10C). El refuerzo con ADN de p55<sup>gag</sup> también indujo respuestas *de novo* contra las regiones de p17<sup>gag</sup> y Gag en el extremo C, aumentando así las respuestas a Gag totales a niveles similares a los obtenidos con la vacuna de ADN gag/p24CE. Adicionalmente, prácticamente el todo el conjunto de respuestas preexistentes contra CE individuales se reforzó en los 6 macacos (Figura 11A, panel de la izquierda). El número de CE que se encontró que era inmunogénico después de la vacunación con p24CE (1-3 CE/animal), aumentó a 2-4 CE/animal con el refuerzo de ADN de Gag. Estos hallazgos confirmaron que las respuestas subóptimas inducidas por la sensibilización con Gag de longitud completa no estaban relacionadas con la ausencia de procesamiento o presentación de péptidos que contienen CE, sino con su incapacidad para inducir respuestas *de novo* en presencia de otros, epítomos de Gag, probablemente más dominantes, fuera de CE. Por tanto, la inmunodominancia ejercida por epítomos de Gag fuera de CE se perdió en presencia de respuestas específicas contra CE preexistentes.

También investigamos si la vacunación con ADN de p24CE podría alterar la inmunidad específica de CE en macacos vacunados previamente con ADN de p55<sup>gag</sup> (Figura 10A; grupo 2). La vacunación con ADN de p24CE aumentó mínimamente las respuestas específicas contra CE preexistentes en 3 de 4 macacos, (Figura 10B, grupo 2) y aumentó moderadamente las respuestas contra CE polifuncionales en dos de los animales vacunados (Figura 10C, grupo 2), aunque este aumento no fue estadísticamente significativo. El análisis del CE individual (Figura 11B) no mostró nuevas respuestas contra CE después del refuerzo con p24CE. El refuerzo con ADN de p24CE heterólogo no modificó la distribución de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> preexistentes. Por tanto, la inmunodominancia ejercida por epítomos fuera de CE no pudo superarse por la vacunación con p24CE, ya que este régimen de vacuna no modificó la magnitud ni la amplitud de las respuestas de Gag.

#### *La vacunación con ADN de p24CE induce respuestas inmunitarias humorales que reconocen a p24<sup>gag</sup>*

El desarrollo de respuestas inmunitarias humorales específicas de Gag también se monitorizó durante el transcurso del estudio (Fig. 12A) utilizando un ELISA específico de p24<sup>gag</sup>. Después de la vacunación con los ADN de p24CE (grupo 1) los anticuerpos que reconocían a p24<sup>gag</sup> fueron fácilmente detectables y alcanzaron su punto máximo 2 semanas después de EP2 (valor medio recíproco del título de dilución del punto final 5,2 log). De manera similar, los títulos de anticuerpos p24<sup>gag</sup> después de la vacunación con ADN de p55<sup>gag</sup> del COT-M también alcanzaron su punto máximo 2 semanas después de EP2 (valor medio recíproco del título de dilución del punto final 5,3 log). Por tanto, ambas vacunas produjeron títulos de anticuerpos p24<sup>gag</sup> similares.

Además, mediante inmunotransferencias de Western, evaluamos la capacidad de estos anticuerpos para reconocer las proteínas p24CE, así como la proteína p24<sup>gag</sup> procesada. Se muestran los datos de dos macacos representativos de cada grupo (grupo 1: L862 y M166, y grupo 2: P574 y R288) obteniéndose datos similares de todos los animales de ambos grupos de vacunas. El plasma de macacos vacunados con p24CE (Grupo 1) reconoció a la proteína p24gag procesada naturalmente producida a partir de un clon molecular de clado B del VIH-1 (Figura 12B, carril 1), así como a las proteínas p24CE1 (carril 2) y p24CE2 (carril 3). Por el contrario, la vacunación con ADN de p55<sup>gag</sup> (grupo 2) indujo anticuerpos que reaccionaban fuertemente con p24<sup>gag</sup> (carril 1), pero que no reconocían a las proteínas p24CE (Figura 12B, carriles 2 y 3). Se llegó a la conclusión de que solo la vacunación con ADN de p24CE induce respuestas celulares y humorales contundentes contra los elementos conservados.

Finalmente, se ensayó si el refuerzo con el ADN heterólogo (EP3) influía en las respuestas inmunitarias humorales

preexistentes. Los análisis ELISA mostraron un aumento similar en los niveles de anticuerpos de p24<sup>gag</sup> en ambos grupos (Figura 12A). Todos los análisis de inmunotransferencia de Western (Figura 12B) se realizaron en paralelo utilizando la misma dilución de muestra de plasma y el mismo tiempo de exposición de la membrana para permitir comparar el antes y el después de los refuerzos respectivos. Tras el refuerzo con ADN de p55<sup>gag</sup> de los animales vacunados con ADN de p24CE (grupo 1), se encontraron reactividades más fuertes tanto para la proteína p24<sup>gag</sup> (carril 4) como para las proteínas p24CE (carriles 5 y 6). Estos datos demuestran que la vacunación con ADN de p55<sup>gag</sup> fue capaz de reforzar sustancialmente las respuestas inmunitarias humerales sensibilizadas con CE a pesar de su incapacidad para inducir respuestas de anticuerpos *de novo* capaces de reconocer a la proteína CE. La vacunación de los animales sensibilizados con ADN de p55<sup>gag</sup> con ADN de p24CE (grupo 2, paneles inferiores) mostró la inducción de anticuerpos contra proteínas p24CE (carriles 5 y 6) y una mayor reactividad contra p24<sup>gag</sup> (carril 4). Nota, se utilizó una cantidad significativamente más alta de plasma para detectar las proteínas p24CE de los animales en el grupo 2 (dilución 1: 500) en comparación con el grupo 1 (dilución 1: 2000). Por tanto, estos datos indican que el refuerzo con ADN heterólogo de p24CE indujo respuestas específicas de CE de bajo nivel, en lugar de inducir respuestas anamnésticas (grupo 2). En conjunto, estos datos muestran que la inmunización de sensibilización con ADN de p24CE puede modificar la inmunodominancia de las respuestas inmunitarias tanto celulares como humerales y que la inmunodominancia de los epítomos fuera de CE no se supera mediante el refuerzo con CE si la vacunación del animal implicó la sensibilización con p55<sup>gag</sup>. Por lo tanto, la sensibilización con ADN de p24CE seguido del refuerzo con ADN de p55<sup>gag</sup> heterólogo es una estrategia preferida para obtener respuestas inmunitarias humerales y celulares amplias y altas contra los elementos muy conservados de la proteína p24<sup>gag</sup> del VIH-1.

### Argumento

Hemos descrito vectores de ADN que codifican colinealmente 7 elementos muy conservados de la proteína p24<sup>gag</sup> del Grupo M del VIH-1, y hemos informado que la vacunación de ratones con estos ADN indujo respuestas tanto celulares como humerales [57]. En este caso, demostramos que la vacunación de macacos *Rhesus* con estos vectores de ADN indujo respuestas inmunitarias celulares y humerales específicas de CE. El análisis detallado de las respuestas inmunitarias celulares mostró que la vacunación con ADN de p24CE indujo linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> citotóxicos contra CE y que las respuestas de linfocitos T suscitadas eran polifuncionales. Por lo tanto, nuestros vectores de ADN de elementos conservados muestran las características deseadas para una vacuna eficaz. Nuestro régimen de vacunas también muestra una estrategia prometedora para superar un problema en el campo de las vacunas contra el VIH, donde los intentos de inducir respuestas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> específicas del antígeno y de ampliar la inmunidad inducida por la vacuna para incluir epítomos subdominantes han sido menos satisfactorios, incluso con una táctica de inmunización de refuerzo con ADN/Ad mediante EP descrita [83].

Cabe destacar que, encontramos que la vacuna de p55<sup>gag</sup> no suscitaba o solo suscitaba malas respuestas contra CE. También analizamos las respuestas de un informe anterior [4], donde los macacos se vacunaron con ADN de p55<sup>gag</sup> de consenso o de mosaico como sensibilización seguido de refuerzo con Adenovirus recombinante. Encontramos que 5 de los 12 animales que recibieron la molécula de consenso y 6 de 12 que recibieron las moléculas en mosaico, desarrollaron respuestas contra CE que variaron de 0-2 (consenso) y de 0-4 (mosaico) respuestas contra CE/animal, mientras que varios epítomos fuera del CE fueron inmunogénicos en todos los animales. En el estudio descrito en el presente documento, encontramos que 5 de los 11 macacos vacunados con ADN de p55<sup>gag</sup> del COT-M o HXB2 de longitud completa desarrollaron respuestas específicas contra CE (0-2 CE/animal), mientras que los epítomos fuera del CE fueron inmunogénicos en todos los macacos. Por tanto, los datos de los dos estudios coinciden en gran medida, aunque los métodos de análisis no fueron idénticos [mapeo peptídico [4] frente a análisis con una mezcla específica de CE de péptidos de 15 y 10 oligómeros (en este informe)]. Independientemente de la naturaleza de la vacuna Gag (consenso, mosaico o tipo silvestre), encontramos respuestas contra CE en solo el 42-50 % de los animales, y las respuestas fueron contra algunos CE/animal, lo que sugiere que los epítomos inmunodominantes dentro de Gag enfocan la respuesta de CTL lejos de estas dianas conservadas. En este informe, analizamos experimentalmente esta hipótesis y demostramos que la inmunodominancia de las regiones variables es, de hecho, responsable de la mala inmunogenicidad del CE.

Aunque la vacunación con p55<sup>gag</sup> o p37<sup>gag</sup> indujo respuestas humerales fuertes, encontramos que estos anticuerpos no reaccionan de forma cruzada con la proteína CE. Por el contrario, nuestra vacuna con ADN de p24CE diseñada fácilmente indujo tanto anticuerpos como respuestas mediadas por células contra a varios CE, evadiendo la restricción asociada a la vacunación con Gag de longitud completa. Cabe destacar que, la inmunización con una Gag de longitud completa reforzó considerablemente las respuestas preexistentes contra CE. Así pues, la exposición al virus también podría tener el efecto de reforzar las respuestas contra CE en individuos vacunados con CE.

En un artículo reciente, Stephenson et al. [17] compararon las respuestas de las moléculas de longitud completa con las de sus elementos conservados (Gag, Pol y Env) y llegaron a la conclusión de que la vacuna de elementos conservados no proporcionaba ningún beneficio (amplitud o magnitud). Por el contrario, demostramos un claro beneficio de la vacuna de CE, mostrando un aumento en la amplitud y magnitud de las respuestas. La diferencia entre los estudios puede deberse sustancialmente a nuestra definición y selección más estrictas de CE, que, a diferencia de otros, se seleccionaron en parte por su asociación con el control de virus [34], lo que adicionalmente respalda su relevancia inmunológica.

Análisis previos de personas infectadas con VIH-1 con diferentes haplotipos de HLA demostraron la presencia de linfocitos T específicos de CE durante la fase crónica de infección [20,34]. Las respuestas de CTL de mayor avidez en estas regiones se identificaron en controladores de VIH y el análisis detallado de las respuestas demostró que, en la mayoría de los epítomos analizados, los controladores pudieron reconocer más variantes peptídicas [34]. Esto indica que la promiscuidad del TCR (receptor de linfocitos T), podría ser beneficiosa para el reconocimiento de epítomos con aminoácidos discordantes produciendo un mejor control de la replicación vírica y de la prevención de mutantes de escape. Estos datos también sugieren que las respuestas específicas de CE de alta avidez se correlacionan posiblemente con el control del VIH. No está claro por qué la vacunación con Gag de longitud completa genera malas respuestas contra CE (en ratones o macacos), mientras que estas respuestas se detectan en la infección crónica por VIH. Sería interesante estudiar diferentes regímenes de vacunación y también examinar el tiempo de desarrollo de las respuestas de CE durante la infección natural. La diferencia en la respuesta inmunitaria suscitada recuerda a un informe anterior de Ferrari et al. [84], quienes demostraron que no pudo inducirse una respuesta inmunodominante de p17<sup>99g</sup> SL9 identificada en personas infectadas con HLA-A\*0201 después de la vacunación con ALVAC-gag en estos voluntarios de haplotipo seleccionado, aunque este epítomo se ha implicado en el efecto tamiz observado en el ensayo clínico STEP de vacuna contra el VIH [85]. Ambos estudios sugieren que puede haber diferencias entre las respuestas celulares inducidas por la vacuna y las inducidas por la infección que deben tenerse en cuenta en el diseño satisfactorio de una vacuna; también resaltan el posible efecto de señuelo inmunodominante de un diseño de inmunógeno de longitud completa.

La inmunogenicidad deteriorada de los elementos conservados en el contexto de la secuencia de la proteína natural podría deberse a la presencia de regiones variables, que pueden ejercer un efecto de señuelo inmunodominante que impide el reconocimiento de los epítomos conservados. Esta posibilidad está respaldada por un estudio reciente en el que se encontró un sesgo hacia regiones menos conservadas en voluntarios humanos vacunados con gag/pol/nef del Ad5 contra el VIH-1 [86]. La generación de respuestas principalmente fuera de los elementos conservados por Gag de longitud completa sugirió un efecto de señuelo inmunodominante. En este contexto, el éxito de nuestra táctica de vacuna de sensibilización con ADN de p24CE y de refuerzo con ADN de p55<sup>99g</sup> es muy importante, porque mostró un fuerte refuerzo de las respuestas celulares y humorales preexistentes específicas contra CE en macacos. Al aumentar el refuerzo con ADN de gag, informamos acerca de un aumento contundente de las respuestas preexistentes específicas de CE como del desarrollo de respuestas *de novo* en regiones fuera de los elementos conservados. Estos datos insinúan que la inmunodominancia ejercida por epítomos de Gag fuera de CE se perdió en el contexto de respuestas preexistentes específicas contra CE.

La inmunogenicidad deteriorada de los elementos conservados cuando se expresa en el contexto de la proteína Gag completa podría estar, en principio, relacionada con el procesamiento y la presentación subóptimos de los péptidos CE, previniendo una sensibilización eficaz de respuestas inmunoadaptativas. Sin embargo, nuestro estudio de sensibilización con p24CE y refuerzo con Gag, demuestra claramente que el procesamiento de la proteína Gag de longitud completa produce una colección de péptidos que contienen CE que son reconocidos por los linfocitos T. Especulamos que el reconocimiento de complejos peptídicos del MHC es menos estricto para reforzar clones de linfocitos T de memoria que para sensibilizar linfocitos T vírgenes. Similar a las observaciones sobre inmunidad celular, las respuestas de linfocitos B preexistentes reforzadas con Gag de longitud completa, aunque no logran sensibilizar el desarrollo de anticuerpos *de novo* son capaces de reconocer a la proteína CE. Estos hallazgos respaldan el concepto de que se realiza un procesamiento adecuado de péptidos que contienen CE de la proteína Gag nativa, y que estos conjuntos de péptidos que contienen CE pueden aumentar posiblemente las respuestas preexistentes a diferentes grados. En conjunto, estos hallazgos apuntan a una diferencia crítica en el reconocimiento de linfocitos T de estos péptidos donde se observa una clara distinción entre linfocitos T vírgenes y con experiencia antigénica.

Entonces surge la pregunta de si una vacuna de linfocitos T puede beneficiarse de las respuestas suscitadas por epítomos de linfocitos T seleccionados. Un informe anterior [87] demostró la fuerza de la inmunidad de linfocitos T en ausencia de la proteína Env. En efecto, un artículo reciente de Mudd et al. [88] mostró que una vacuna de linfocitos T que indujo respuestas de linfocitos T CD8<sup>+</sup> restringidas a Mamu-B\*08 dirigidas a 3 epítomos víricos diferentes, suscitó respuestas capaces de controlar la replicación del VIS<sub>mac239</sub>. Dado que nuestra vacuna de ADN CE se seleccionó para secuencias muy restringidas y haplotipos independientes, es plausible que ellos también puedan inducir respuestas tan fuertes, que se abordarán en futuros estudios.

Los resultados presentados contribuyen significativamente al desarrollo de vacunas candidatas mejoradas contra el VIH dirigidas a las respuestas inmunitarias en regiones esenciales muy conservadas para el virus. Nuestra hipótesis es que las respuestas inmunitarias celulares dirigidas a regiones conservadas del VIH y a otros patógenos muy variables, que no permiten mutaciones de escape rápido sin pérdida significativa de capacidad replicativa del virus, son más propensas a ser protectoras [32-34]. Dado que existen pruebas de que las respuestas inducidas por la vacuna pueden cambiar después de una infección por VIH, lo que da como resultado el escape de virus en seres humanos [89], una selección de elementos estrictamente conservados es de gran importancia para el diseño de una vacuna eficaz. Dicha selección también debe evitar epítomos que puedan actuar como señuelos inmunodominantes. Por tanto, una vacuna satisfactoria debe ser capaz de generar fuertes respuestas humorales y celulares específicas de clados cruzados contra regiones conservadas del virus. Nuestros resultados proporcionan una táctica eficaz para superar las restricciones asociadas a la inmunodominancia, mejorando al mismo tiempo la magnitud y la amplitud de las respuestas, especialmente aquellas contra regiones conservadas, minimizando la posibilidad de escape vírico al mismo tiempo

que aumenta el reconocimiento de cepas del VIH divergentes de origen natural. Estos resultados indican que para ampliar este concepto a todo el proteoma del VIH debe diseñarse una vacuna candidata. Dado que en general se demostró que el modelo con macacos proporciona una jerarquía de respuesta similar a la obtenida sobre la vacunación de seres humanos comparando diferentes plataformas de vacunas [90], nuestro estudio en macacos respalda la evaluación de las nuevas estrategias de vacunas con EC en seres humanos.

## Materiales y métodos

### *Vectores de ADN*

Los plásmidos de p24CE, pPS-p24CE1 (plásmido 234H) y pPS-p24CE2 (plásmido 235H) se han descrito [57] y contienen el péptido señal de GM-CSF humano en el extremo N del marco abierto de lectura de p24CE con expresión optimizada. En resumen, los 7 CE se ensamblaron colinealmente en el orden CE2-3-4-5-6-7-1 para evitar un CE1 N-terminal fuertemente hidrófobo, y se conectaron mediante secuencias enlazadoras cortas diseñadas para una escisión proteolítica eficaz [91,92]. El ADN de p55<sup>99g</sup> del COT-M [93] (plásmido 222H) expresa la Gag de longitud completa de un gen de ARN/optimizado con codones. El ADN de IL-12 (plásmido AG157) produce la citocina IL-12 del macaco *Rhesus* a partir de un vector de expresión optimizado [94,95]. El vector de vacuna CMVkan [81] está compuesto por un esqueleto plasmídico optimizado para el crecimiento en bacterias, el promotor de citomegalovirus (CMV) humano sin intrones, los genes de p24CE o gag optimizados, el sitio de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino (BGH) y el gen de resistencia a kanamicina. Los ADN sin endotoxina (Qiagen, Valencia, CA) se prepararon según el protocolo del fabricante.

### Ejemplo 3-polipéptidos de elementos conservados adicionales

Se diseñaron elementos conservados alternativos (Figura 13). En resumen, CE1 se extendió para proporcionar CE8. CE2 se extendió para proporcionar CE9. En esta construcción se eliminó CE7. Por consiguiente, en el polipéptido CE hay seis elementos conservados. Hubo dos variantes del polipéptido del elemento conservado en las que se cambió un aminoácido en CE8 y CE9. Se diseñaron dos versiones que tenían diferentes disposiciones de los CE. En la versión denominada "p24CEc" (p24CE1c y p24CE2c), el orden es CE8-9-2-3-4-6. En la versión denominada "p24CEd" (p24CE1d y p24CE2d), el orden es CE9-3-4-5-6-8.

### Ejemplo 4. Datos ilustrativos de 3 programas de sensibilización y refuerzo diferentes de la vacunación.

Se ensayaron tres tácticas de vacunación diferentes en las que se modificó el orden de las vacunas de elementos conservados y el de la vacuna de gag de longitud completa. En la Figura 20 se muestran los tres protocolos:

1. sensibilización con p24CE seguido de refuerzo con p55gag
2. sensibilización con p55gag seguido de refuerzo con p24CE
3. combinación de p24CE y p55gag en todas las vacunaciones.

Los animales recibieron 1 mg de cada ADN. En el caso de p24CE, se utilizaron PS-p24CE1 y PSp24CE2. El ADN se administró por vía intramuscular seguido de electroporación *in vivo*. La Figura 21 muestra las respuestas inmunitarias celulares antes y después del refuerzo. Las respuestas inmunitarias celulares se midieron con péptidos (solapamiento de 15 oligómeros en 11 aminoácidos) que abarcaban toda la proteína p24gag. Este análisis mostró respuestas en todos los animales vacunados.

Los animales también se analizaron en busca de respuestas específicas de CE utilizando un conjunto de péptidos (mezcla de péptidos de 10 oligómeros que se solapan en 9 aminoácidos y de 15 oligómeros que se solapan en 11 aminoácidos) que abarcaban los 7 CE. Todos los animales vacunados con p24CE mostraron respuestas positivas. Por el contrario, solo 5 de los 11 animales vacunados con ADN de gag mostraron respuestas (datos mostrados). Tres de los 4 animales vacunados con la vacuna de combinación (p24CE+p55<sup>99g</sup>) mostraron respuestas positivas. Después del refuerzo con ADN de p55gag, los animales sensibilizados con p24CE aumentaron significativamente las respuestas específicas de CE. El refuerzo con ADN de p24CE aumentó las respuestas de los animales vacunados con gag (aumento no significativo). Una tercera vacunación de los animales vacunados con la combinación (p24CE+p55gag) no aumentó las respuestas de manera consistente.

La Figura 22 muestra el análisis de las respuestas contra CE individuales. Las respuestas a cada CE se mapearon en todos los animales utilizando péptidos específicos de CE (mezcla de péptidos de 10 oligómeros que se solapan en 9 aminoácidos y de péptidos de 15 oligómeros que se solapan en 11 aminoácidos) para cada CE. Se muestra el número de CE que mostró respuestas positivas por animal. Los animales sensibilizados con p24CE tuvieron tasas de respuesta del 100 % con un intervalo de 1-3 CE/animal y una mediana de 3 CE por animal. Los animales sensibilizados con ADN de gag tuvieron una tasa de respuesta del 45 % con un intervalo de 0-2 CE/animal. Los animales que recibieron la vacuna de combinación son más similares a los animales sensibilizados con CE.

La Figura 23 muestra que las diferentes tácticas de vacunación indujeron niveles similares de respuestas de

anticuerpos contra p27gag. Los títulos de los anticuerpos de unión se midieron en el plasma de los macacos mediante un ensayo ELISA.

## Referencias

- 5 1. Nickle DC, Rolland M, Jensen MA, Pond SL, Deng W, et al. (2007) Coping with viral diversity in HIV vaccine design. *PLoS Comput Biol* 3: e75.
- 10 2. Nickle DC, Jojic N, Heckerman D, Jojic V, Kirovski D, et al. (2008) Comparison of immunogen designs that optimize peptide coverage: reply to Fischer et al. *PLoS Comput Biol* 4: e25.
- 15 3. Barouch DH, O'Brien KL, Simmons NL, King SL, Abbink P, et al. (2010) Mosaic HIV-1 vaccines expand the breadth and depth of cellular immune responses in rhesus monkeys. *Nat Med* 16: 319-323.
- 20 4. Santra S, Liao HX, Zhang R, Muldoon M, Watson S, et al. (2010) Mosaic vaccines elicit CD8+ T lymphocyte responses that confer enhanced immune coverage of diverse HIV strains in monkeys. *Nat Med* 16: 324-328.
- 25 5. Fischer W, Perkins S, Theiler J, Bhattacharya T, Yusim K, et al. (2007) Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants. *Nat Med* 13: 100-106.
- 30 6. Fischer W, Liao HX, Haynes BF, Letvin NL, Korber B (2008) Coping with viral diversity in HIV vaccine design: una respuesta a Nickle et al. *PLoS Comput Biol* 4: e15; respuesta del autor e25.
- 35 7. Doria-Rose NA, Learn GH, Rodrigo AG, Nickle DC, Li F, et al. (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: 11214-11224.
- 40 8. Mullins JI, Nickle DC, Heath L, Rodrigo AG, Learn GH (2004) Immunogen sequence: the fourth tier of AIDS vaccine design. *Expert Rev Vaccines* 3: S151-159.
- 45 9. Nickle DC, Jensen MA, Gottlieb GS, Shriner D, Learn GH, et al. (2003) Consensus and ancestral state HIV vaccines. *Science* 299: 1515-1518; author reply 1515-1518.
- 50 10. Dahirel V, Shekhar K, Pereyra F, Miura T, Artyomov M, et al. (2011) Coordinate linkage of HIV evolution reveals regions of immunological vulnerability. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 11530-11535.
- 55 11. Letourneau S, Im EJ, Mashishi T, Brereton C, Bridgeman A, et al. (2007) Design and pre-clinical evaluation of a universal HIV-1 vaccine. *PLoS One* 2: e984.
- 60 12. Rosario M, Bridgeman A, Quakkelaar ED, Quigley MF, Hill BJ, et al. (2010) Long peptides induce polyfunctional T cells against conserved regions of HIV-1 with superior breadth to single-gene vaccines in macaques. *Eur J Immunol* 40: 1973-1984.
- 65 13. De Groot AS, Rivera DS, McMurry JA, Buus S, Martin W (2008) Identification of immunogenic HLA-B7 "Achilles' heel" epitopes within highly conserved regions of HIV. *Vaccine* 26: 3059-3071.
14. Wilson CC, McKinney D, Anders M, MaWhinney S, Forster J, et al. (2003) Development of a DNA vaccine designed to induce cytotoxic T lymphocyte responses to multiple conserved epitopes in HIV-1. *J Immunol* 171: 5611-5623.
15. Kaufman DR, Li F, Cruz AN, Self SG, Barouch DH (2012) Focus and breadth of cellular immune responses elicited by a heterologous insert prime-boost vaccine regimen in rhesus monkeys. *Vaccine* 30: 506-509.
16. Almeida RR, Rosa DS, Ribeiro SP, Santana VC, Kallas EG, et al. (2012) Broad and cross-clade CD4+ T-cell responses elicited by a DNA vaccine encoding highly conserved and promiscuous HIV-1 M-group consensus peptides. *PLoS One* 7: e45267.
17. Stephenson KE, SanMiguel A, Simmons NL, Smith K, Lewis MG, et al. (2012) Full-length HIV-1 immunogens induce greater magnitude and comparable breadth of T lymphocyte responses to conserved HIV-1 regions compared with conserved-region-only HIV-1 immunogens in rhesus monkeys. *J Virol* 86: 11434-11440.
18. Lichterfeld M, Yu XG, Le Gall S, Altfeld M (2005) Immunodominance of HIV-1-specific CD8(+) T-cell responses in acute HIV-1 infection: at the crossroads of viral and host genetics. *Trends Immunol* 26: 166-171.
19. Friedrich TC, Valentine LE, Yant LJ, Rakasz EG, Piaskowski SM, et al. (2007) Subdominant CD8+ T-cell responses are involved in durable control of AIDS virus replication. *J Virol* 81: 3465-3476.

20. Liu Y, McNevin J, Rolland M, Zhao H, Deng W, et al. (2009) Conserved HIV-1 epitopes continuously elicit subdominant cytotoxic T-lymphocyte responses. *J Infect Dis* 200: 1825-1833.
- 5 21. Liu J, Ewald BA, Lynch DM, Nanda A, Sumida SM, et al. (2006) Modulation of DNA vaccine-elicited CD8+ T-lymphocyte epitope immunodominance hierarchies. *J Virol* 80: 11991-11997.
22. Frahm N, Kiepiela P, Adams S, Linde CH, Hewitt HS, et al. (2006) Control of human immunodeficiency virus replication by cytotoxic T lymphocytes targeting subdominant epitopes. *Nat Immunol* 7: 173-178.
- 10 23. Bockl K, Wild J, Bredl S, Kindsmuller K, Kostler J, et al. (2012) Altering an Artificial GagPolnef Polyprotein and Mode of ENV Co-Administration Affects the Immunogenicity of a Clade C HIV DNA Vaccine. *PLoS One* 7: e34723.
24. Iversen AK, Stewart-Jones G, Learn GH, Christie N, Sylvester-Hviid C, et al. (2006) Conflicting selective forces affect T cell receptor contacts in an immunodominant human immunodeficiency virus epitope. *Nat Immunol* 7: 179-189.
- 15 25. Schneidewind A, Brumme ZL, Brumme CJ, Power KA, Reyor LL, et al. (2009) Transmission and long-term stability of compensated CD8 escape mutations. *J Virol* 83: 3993-3997.
- 20 26. Altfeld M, Kalife ET, Qi Y, Streeck H, Lichterfeld M, et al. (2006) HLA Alleles Associated with Delayed Progression to AIDS Contribute Strongly to the Initial CD8(+) T Cell Response against HIV-1. *PLoS Med* 3: e403.
27. Friedrich D, Jalbert E, Dinges WL, Sidney J, Sette A, et al. (2011) Vaccine-induced HIV-specific CD8+ T cells utilize preferential HLA alleles and target-specific regions of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr* 58: 248-252.
- 25 28. Maurer K, Harrer EG, Goldwisch A, Eismann K, Bergmann S, et al. (2008) Role of cytotoxic T-lymphocyte-mediated immune selection in a dominant human leukocyte antigen-B8-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope in Nef. *J Acquir Immune Defic Syndr* 48: 133-141.
- 30 29. Toapanta FR, Craigo JK, Montelaro RC, Ross TM (2007) Reduction of anti-HIV-1 Gag immune responses during co-immunization: immune interference by the HIV-1 envelope. *Current HIV research* 5: 199-209.
- 35 30. Morozov VA, Morozov AV, Semaan M, Denner J (2012) Single mutations in the transmembrane envelope protein abrogate the immunosuppressive property of HIV-1. *Retrovirology* 9: 67.
31. Hovav AH, Santosuosso M, Bivas-Benita M, Plair A, Cheng A, et al. (2009) X4 human immunodeficiency virus type 1 gp120 down-modulates expression and immunogenicity of codelivered antigens. *Journal of virology* 83: 10941-10950.
- 40 32. Rolland M, Nickle DC, Mullins JI (2007) HIV-1 group M conserved elements vaccine. *PLoS Pathog* 3: e157.
33. Niu L, Termini JM, Kanagavelu SK, Gupta S, Rolland MM, et al. (2011) Preclinical evaluation of HIV-1 therapeutic ex vivo dendritic cell vaccines expressing consensus Gag antigens and conserved Gag epitopes. *Vaccine* 29: 2110-2119.
- 45 34. Mothe B, Llano A, Ibarrondo J, Zamarreno J, Schiaulini M, et al. (2012) CTL responses of high functional avidity and broad variant cross-reactivity are associated with HIV control. *PLoS One* 7: e29717.
- 50 35. Herbeck JT, Nickle DC, Learn GH, Gottlieb GS, Curlin ME, et al. (2006) Human immunodeficiency virus type 1 env evolves toward ancestral states upon transmission to a new host. *J Virol* 80: 1637-1644.
36. Duda A, Lee-Turner L, Fox J, Robinson N, Dustan S, et al. (2009) HLA-associated clinical progression correlates with epitope reversion rates in early human immunodeficiency virus infection. *J Virol* 83: 1228-1239.
- 55 37. Kent SJ, Fernandez CS, Dale CJ, Davenport MP (2005) Reversion of immune escape HIV variants upon transmission: insights into effective viral immunity. *Trends Microbiol* 13: 243-246.
38. Li B, Gladden AD, Altfeld M, Kaldor JM, Cooper DA, et al. (2007) Rapid reversion of sequence polymorphisms dominates early human immunodeficiency virus type 1 evolution. *J Virol* 81: 193-201.
- 60 39. Martinez-Picado J, Prado JG, Fry EE, Pfafferott K, Leslie A, et al. (2006) Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 80: 3617-3623.
- 65 40. Peyerl FW, Bazick HS, Newberg MH, Barouch DH, Sodroski J, et al. (2004) Fitness costs limit viral escape from cytotoxic T lymphocytes at a structurally constrained epitope. *J Virol* 78: 13901-13910.

41. Liu Y, McNevin J, Zhao H, Tebit DM, Troyer RM, et al. (2007) Evolution of human immunodeficiency virus type 1 cytotoxic T-lymphocyte epitopes: fitness-balanced escape. *J Virol* 81: 12179-12188.
- 5 42. Troyer RM, Collins KR, Abraha A, Fraundorf E, Moore DM, et al. (2005) Changes in human immunodeficiency virus type 1 fitness and genetic diversity during disease progression. *J Virol* 79: 9006-9018.
43. Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, et al. (2007) CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med* 13: 46-53.
- 10 44. Honeyborne I, Prendergast A, Pereyra F, Leslie A, Crawford H, et al. (2007) Control of human immunodeficiency virus type 1 is associated with HLA-B\*13 and targeting of multiple gag-specific CD8+ T-cell epitopes. *J Virol* 81: 3667-3672.
- 15 45. Schneidewind A, Brockman MA, Yang R, Adam RI, Li B, et al. (2007) Escape from the dominant HLA-B27-restricted cytotoxic T-lymphocyte response in Gag is associated with a dramatic reduction in human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 81: 12382-12393.
- 20 46. Ngumbela KC, Day CL, Mncube Z, Nair K, Ramduth D, et al. (2008) Targeting of a CD8 T cell env epitope presented by HLA-B\*5802 is associated with markers of HIV disease progression and lack of selection pressure. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24: 72-82.
47. Rolland M, Heckerman D, Deng W, Rousseau CM, Coovadia H, et al. (2008) Broad and Gag-biased HIV-1 epitope repertoires are associated with lower viral loads. *PLoS One* 3: e1424.
- 25 48. Masemola A, Mashishi T, Khoury G, Mohube P, Mokgotho P, et al. (2004) Hierarchical targeting of subtype C human immunodeficiency virus type 1 proteins by CD8+ T cells: correlation with viral load. *J Virol* 78: 3233-3243.
- 30 49. Mothe B, Ibarrondo J, Llano A, Brander C (2009) Virological, immune and host genetics markers in the control of HIV infection. *Dis Markers* 27: 105-120.
50. Zuniga R, Lucchetti A, Galvan P, Sanchez S, Sanchez C, et al. (2006) Relative dominance of Gag p24-specific cytotoxic T lymphocytes is associated with human immunodeficiency virus control. *J Virol* 80: 3122-3125.
- 35 51. Mothe B, Llano A, Ibarrondo J, Daniels M, Miranda C, et al. (2011) Definition of the viral targets of protective HIV-1-specific T cell responses. *J Transl Med* 9: 208.
52. Assarsson E, Sidney J, Oseroff C, Pasquetto V, Bui HH, et al. (2007) A quantitative analysis of the variables affecting the repertoire of T cell specificities recognized after vaccinia virus infection. *J Immunol* 178: 7890-7901.
- 40 53. Altfeld M, Allen TM (2006) Hitting HIV where it hurts: an alternative approach to HIV vaccine design. *Trends Immunol* 27: 504-510.
54. Rosario M, Borthwick N, Stewart-Jones GB, Mbewe-Mvula A, Bridgeman A, et al. (2012) Prime-boost regimens with adjuvanted synthetic long peptides elicit T cells and antibodies to conserved regions of HIV-1 in macaques. *AIDS* 26: 275-284.
- 45 55. Ribeiro SP, Rosa DS, Fonseca SG, Mairena EC, Postol E, et al. (2010) A vaccine encoding conserved promiscuous HIV CD4 epitopes induces broad T cell responses in mice transgenic to multiple common HLA class II molecules. *PLoS One* 5: e11072.
- 50 56. Rosa DS, Ribeiro SP, Almeida RR, Mairena EC, Postol E, et al. (2011) A DNA vaccine encoding multiple HIV CD4 epitopes elicits vigorous polyfunctional, long-lived CD4+ and CD8+ T cell responses. *PLoS One* 6: e16921.
57. Kulkarni V, Rosati M, Valentin A, Ganneru B, Singh AK, et al. An HIV-1 p24gag derived conserved element DNA vaccine increased the breadth of immune response in mice. submitted.
- 55 58. Winstone N, Wilson AJ, Morrow G, Boggiano C, Chiuchiolo MJ, et al. (2011) Enhanced control of pathogenic SIVmac239 replication in macaques immunized with a plasmid IL12 and a DNA prime, viral vector boost vaccine regimen. *J Virol* 85: 9578-9587.
- 60 59. Aihara H, Miyazaki J (1998) Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nat Biotechnol* 16: 867-870.
60. Mathiesen I (1999) Electropermeabilization of skeletal muscle enhances gene transfer *in vivo*. *Gene Ther* 6: 508-514.
- 65 61. Prud'homme GJ, Glinka Y, Khan AS, Draghia-Akli R (2006) Electroporation-enhanced nonviral gene transfer

- for the prevention or treatment of immunological, endocrine and neoplastic diseases. *Curr Gene Ther* 6: 243-273.
62. Rizzuto G, Cappelletti M, Maione D, Savino R, Lazzaro D, et al. (1999) Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6417-6422.
- 5 63. Wang Z, Troilo PJ, Wang X, Griffiths TG, Pacchione SJ, et al. (2004) Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther* 11: 711-721.
- 10 64. Widera G, Austin M, Rabussay D, Goldbeck C, Barnett SW, et al. (2000) Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation *in vivo*. *J Immunol* 164: 4635-4640.
65. Otten G, Schaefer M, Doe B, Liu H, Srivastava I, et al. (2004) Enhancement of DNA vaccine potency in rhesus macaques by electroporation. *Vaccine* 22: 2489-2493.
- 15 66. Otten GR, Schaefer M, Doe B, Liu H, Megede JZ, et al. (2006) Potent immunogenicity of an HIV-1 gag-pol fusion DNA vaccine delivered by *in vivo* electroporation. *Vaccine* 24: 4503-4509.
67. Rosati M, Valentin A, Jalah R, Patel V, von Gegerfelt A, et al. (2008) Increased immune responses in rhesus macaques by DNA vaccination combined with electroporation. *Vaccine* 26: 5223-5229.
- 20 68. Luckay A, Sidhu MK, Kjekken R, Megati S, Chong SY, et al. (2007) Effect of plasmid DNA vaccine design and *in vivo* electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *J Virol* 81: 5257-5269.
- 25 69. Hirao LA, Wu L, Khan AS, Hokey DA, Yan J, et al. (2008) Combined effects of IL-12 and electroporation enhances the potency of DNA vaccination in macaques. *Vaccine* 26: 3112-3120.
70. Rosati M, Bergamaschi C, Valentin A, Kulkarni V, Jalah R, et al. (2009) DNA vaccination in rhesus macaques induces potent immune responses and decreases acute and chronic viremia after SIVmac251 challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 06: 15831-15836.
- 30 71. Patel V, Valentin A, Kulkarni V, Rosati M, Bergamaschi C, et al. (2010) Long-lasting humoral and cellular immune responses and mucosal dissemination after intramuscular DNA immunization. *Vaccine* 28: 4827-4836.
- 35 72. Vasan S, Schlesinger SJ, Chen Z, Hurley A, Lombardo A, et al. (2010) Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of ADMVA, a multigenic, modified vaccinia Ankara-HIV-1 B/C candidate vaccine. *PLoS One* 5: e8816.
73. Nasioulas G, Zolotukhin AS, Taberner C, Solomin L, Cunningham CP, et al. (1994) Elements distinct from human immunodeficiency virus type 1 splice sites are responsible for the Rev dependence of env mRNA. *J Virol* 68: 2986-2993.
- 40 74. Schneider R, Campbell M, Nasioulas G, Felber BK, Pavlakis GN (1997) Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J Virol* 71: 4892-4903.
- 45 75. Schwartz S, Campbell M, Nasioulas G, Harrison J, Felber BK, et al. (1992) Mutational inactivation of an inhibitory sequence in human immunodeficiency virus type 1 results in Rev-independent gag expression. *J Virol* 66: 7176-7182.
- 50 76. Schwartz S, Felber BK, Pavlakis GN (1992) Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein. *J Virol* 66: 150-159.
77. Andre S, Seed B, Eberle J, Schraut W, Bultmann A, et al. (1998) Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J Virol* 72: 1497-1503.
- 55 78. Wagner R, Graf M, Bieler K, Wolf H, Grunwald T, et al. (2000) Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus: implications for the safety of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 11: 2403-2413.
- 60 79. Graf M, Deml L, Wagner R (2004) Codon-optimized genes that enable increased heterologous expression in mammalian cells and elicit efficient immune responses in mice after vaccination of naked DNA. *Methods Mol Med* 94: 197-210.
- 65 80. Kulkarni V, Jalah R, Ganneru B, Bergamaschi C, Alicea C, et al. (2011) Comparison of immune responses generated by optimized DNA vaccination against SIV antigens in mice and macaques. *Vaccine* 29: 6742-6754.

81. Rosati M, von Gegerfelt A, Roth P, Alicea C, Valentin A, et al. (2005) DNA vaccines expressing different forms of simian immunodeficiency virus antigens decrease viremia upon SIVmac251 challenge. *J Virol* 79: 8480-8492.
- 5 82. Valentin A, Chikhlikar P, Patel V, Rosati M, Maciel M, et al. (2009) Comparison of DNA vaccines producing HIV-1 Gag and LAMP/Gag chimera in rhesus macaques reveals antigen-specific T-cell responses with distinct phenotypes. *Vaccine* 27: 4840-4849.
- 10 83. Vojnov L, Bean AT, Peterson EJ, Chiuchiolo MJ, Sacha JB, et al. (2011) DNA/Ad5 vaccination with SIV epitopes induced epitope-specific CD4 T cells, but few subdominant epitope-specific CD8 T cells. *Vaccine* 29: 7483-7490.
- 15 84. Ferrari G, Neal W, Ottinger J, Jones AM, Edwards BH, et al. (2004) Absence of immunodominant anti-Gag p17 (SL9) responses among Gag CTL-positive, HIV-uninfected vaccine recipients expressing the HLA-A\*0201 allele. *J Immunol* 173: 2126-2133.
85. Rolland M, Tovanabutra S, deCamp AC, Frahm N, Gilbert PB, et al. (2011) Genetic impact of vaccination on breakthrough HIV-1 sequences from the STEP trial. *Nat Med* 17: 366-371.
- 20 86. Li F, Finnefrock AC, Dubey SA, Korber BT, Szinger J, et al. Mapping HIV-1 vaccine induced T-cell responses: bias towards less-conserved regions and potential impact on vaccine efficacy in the Step study. *PLoS One* 6: e20479.
- 25 87. Wilson NA, Keele BF, Reed JS, Piaskowski SM, MacNair CE, et al. (2009) Vaccine-induced cellular responses control simian immunodeficiency virus replication after heterologous challenge. *J Virol* 83: 6508-6521.
88. Mudd PA, Martins MA, Ericson AJ, Tully DC, Power KA, et al. (2012) Vaccine-induced CD8+ T cells control AIDS virus replication. *Nature* 491: 129-133.
- 30 89. Betts MR, Exley B, Price DA, Bansal A, Camacho ZT, et al. (2005) Characterization of functional and phenotypic changes in anti-Gag vaccine-induced T cell responses and their role in protection after HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4512-4517.
- 35 90. Bett AJ, Dubey SA, Mehrotra DV, Guan L, Long R, et al. (2010) Comparison of T cell immune responses induced by vectored HIV vaccines in non-human primates and humans. *Vaccine* 28: 7881-7889.
91. Le Gall S, Stamegna P, Walker BD (2007) Portable flanking sequences modulate CTL epitope processing. *J Clin Invest* 117: 3563-3575.
- 40 92. Zhang SC, Martin E, Shimada M, Godfrey SB, Fricke J, et al. (2012) Aminopeptidase Substrate Preference Affects HIV Epitope Presentation and Predicts Immune Escape Patterns in HIV-Infected Individuals. *J Immunol* 188: 5924-5934.
- 45 93. Rolland M, Jensen MA, Nickle DC, Yan J, Learn GH, et al. (2007) Reconstruction and function of ancestral center-of-tree human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J Virol* 81: 8507-8514.
94. Jalah R, Patel V, Kulkarni V, Rosati M, Alicea C, et al. (2012) IL-12 DNA as molecular vaccine adjuvant increases the cytotoxic T cell responses and breadth of humoral immune responses in SIV DNA vaccinated macaques. *Hum Vaccin Immunother* 8: 1620-1629.
- 50 95. Jalah R, Rosati M, Ganneru B, Pilkington GR, Valentin A, et al. (2013) The p40 Subunit of IL-12 Promotes Stabilization and Export of the p35 Subunit: Implications for Improved IL-12 Cytokine Production. *J Biol Chem* in press.
- 55 96. Hanke T, McMichael A (1999) Pre-clinical development of a multi-CTL epitope-based DNA prime MVA boost vaccine for AIDS. *Immunol Lett* 66: 177-181.
97. Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Kelly BN, Hua Y, Whitby FG, et al. (2009) X-ray structures of the hexameric building block of the HIV capsid. *Cell* 137: 1282-1292.
- 60 98. Chikhlikar P, de Arruda LB, Maciel M, Silvera P, Lewis MG, et al. (2006) DNA encoding an HIV-1 Gag/human lysosome-associated membrane protein-1 chimera elicits a broad cellular and humoral immune response in Rhesus macaques. *PLoS ONE* 1: e135.
- 65 99. de Arruda LB, Chikhlikar PR, August JT, Marques ET (2004) DNA vaccine encoding human immunodeficiency virus-1 Gag, targeted to the major histocompatibility complex II compartment by lysosomal-associated membrane protein, elicits enhanced long-term memory response. *Immunology* 112: 126-133.

- 5 100. Marques ET, Jr., Chikhlikar P, de Arruda LB, Leao IC, Lu Y, et al. (2003) HIV-1 p55Gag encoded in the lysosome-associated membrane protein-1 as a DNA plasmid vaccine chimera is highly expressed, traffics to the major histocompatibility class II compartment, and elicits enhanced immune responses. *J Biol Chem* 278: 37926-37936.
- 10 101. Valentin A, Chikhlikar P, Patel V, Rosati M, Maciel M, et al. (2009) Comparison of DNA vaccines producing HIV-1 Gag and LAMP/Gag chimera in rhesus macaques reveals antigen-specific T-cell responses with distinct phenotypes. *Vaccine* 27: 4840-4849.
- 15 102. Qiu JT, Song R, Dettenhofer M, Tian C, August T, et al. (1999) Evaluation of novel human immunodeficiency virus type 1 Gag DNA vaccines for protein expression in mammalian cells and induction of immune responses. *J Virol* 73: 9145-9152.
- 20 103. von Gegerfelt A, Valentin A, Alicea C, Van Rompay KK, Marthas ML, et al. (2010) Emergence of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic CD4+ T cells and increased humoral responses correlate with control of rebounding viremia in CD8-depleted macaques infected with Rev-independent live-attenuated simian immunodeficiency virus. *J Immunol* 185: 3348-3358.
- 25 104. Lazaro E, Kadie C, Stamegna P, Zhang SC, Gourdain P, et al. (2011) Variable HIV peptide stability in human cytosol is critical to epitope presentation and immune escape. *J Clin Invest* 121: 2480-2492.
- 30 105. Schwartz S, Felber BK, Pavlakis GN (1992) Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs. *Mol Cell Biol* 12: 207-219.
106. Rolland M, Jensen MA, Nickle DC, Yan J, Learn GH, et al. (2007) Reconstruction and function of ancestral center-of-tree human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J Virol* 81: 8507-8514.
107. Shiver J (2003) A non-replicating adenoviral vector as a potential HIV vaccine. *The Body Pro* <http://www.thebodypro.com/content/art34193.html?ts=pf>.

**Tabla de secuencias ilustrativas de elementos conservados**

- 35 **Elementos conservados p24 Gag para la vacuna p24CE1 ("también conocida como "Nucleocápside1"): SEQ ID NO:1 elemento conservado 1 (CE1)**  
ISPRTLNAWVKV
- 40 **SEQ ID NO:2 elemento conservado 2 (CE2)**  
VIPMFSALSEGATPQDLN
- SEQ ID NO:3 elemento conservado 3 (CE3)**  
VGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDR
- 45 **SEQ ID NO:4 elemento conservado 4 (CE4)**  
PRGSDIAGTTSTLQEIQIW
- SEQ ID NO:5 elemento conservado 5 (CE5)**  
KRWIILGLNKIVRMYSPTSI
- 50 **SEQ ID NO:6 elemento conservado 6 (CE6)**  
YVDRFYKTLRAEQA
- SEQ ID NO:7 elemento conservado 7 (CE7)**  
LEEMMTACQGVGGPGHK
- 55 **Elementos conservados p24 Gag para la vacuna p24CE2 ("también conocida como "Nucleocápside2"): SEQ ID NO:8 elemento conservado 1 (CE1)**  
LSPRTLNAWVKV
- 60 **SEQ ID NO:9 elemento conservado 2 (CE2)**  
VIPMFTALSEGATPQDLN
- SEQ ID NO:10 elemento conservado 3 (CE3)**  
VGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDR
- 65 **SEQ ID NO:11 elemento conservado 4 (CE4)**

PRGSDIAGTTSTLQEQIAW

**SEQ ID NO:12 elemento conservado 5 (CE5)**  
KRWIILGLNKIVRMYSVSI

5

**SEQ ID NO:13 elemento conservado 6 (CE6)**  
YVDRFFKTLRAEQA

10

**SEQ ID NO:14 elemento conservado 7 (CE7)**  
LEEMMTACQGVGGPSHK

**SEQ ID NO: 15 elementos conservados p24 Gag para la vacuna p24CE1 ("también conocida como "Nucleocápside1"):**

VIPMFSALSEGATPQDLNAAVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAC  
TTSTLQEQIGWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQAAGLEEM  
15 MTACQGVGGPGHKAALSPRTLNAWVKV

**SEQ ID NO: 16 elementos conservados p24 Gag para la vacuna p24CE2 ("también conocida como "Nucleocápside2"):**

VIPMFTALSEGATPQDLNAAVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAC  
TTSTLQEQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYSVPSIAAKYVDRFFKTLRAEQAAGLEEM  
20 MTACQGVGGPSHKAALSPRTLNAWVKV

**SEQ ID NO: 17 construcción de ácido nucleico que codifica la Nucleocápside1 y la Nucleocápside2 (p24CE1+p24CE2) (306H) (genes subrayados)**

CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAAATATGTACATTTATATTGGCTCA  
TGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATC  
AATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTCCGCGTTACATAACTT  
ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCA  
ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAAT  
GGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT  
GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTAT  
GCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAG  
25 TCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA

GCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGT  
 TTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCC  
 CATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAG  
 CTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCT  
 CCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGGegegegtgacaagaaATGTGGC  
TCCAGAGCCTGCTACTCCTGGGGACGGTGGCCTGCAGCATCTCGGTCATCCCGAT  
GTTCTCGGCGCTCAGCGAGGGAGCGACGCCGACGACCTGAACGCGGCCGTCGG  
AGGTCACCAGGCAGCGATGCAGATGCTGAAGGACACGATCAACGAGGAGGCGG  
CCGAGTGGGACCGGGCGGCAGCCGAGCCACGCGGTTCCGACATCGCGGGCACCA  
CCTCGACGCTCCAGGAGCAGATCGGGTGGGCCGAGCTAAGCGCTGGATCATCC  
TCGGGCTGAACAAGATCGTCCGGATGTACAGCCCGACGTCGATCGCTGCTAAGT  
ACGTTGACCGGTTCTACAAGACCCTGAGGGCCGAGCAGGCGGCCGGACTGGAGG  
AGATGATGACCGCGTGCCAGGGGGTCGGTGGACCAGGGCACAAGGCCGCGATCT  
CGCCGCGCACGCTGAACCGGTGGGTGAAGGTCTGATAAgaattegetagegegeccagatc  
 gatateggatctGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGC  
 CTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGA  
 AATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGG  
 CAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGC  
 GGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCC  
 AGAAAGAAGCAGGCACATCCCCTTCTCTGTGACACACCCTGTCCACGCCCTGTT  
 TCTTAGTTCCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTC  
 AATCCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCA  
 AACCAAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAA  
 GTGCAGAGGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAATC  
 ATAGAATTTCTTCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTG  
 CGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCA  
 GGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAA  
 CCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAG  
 CATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAA  
 AGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCT  
 GCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTC  
 ATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGG  
 CTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTAT  
 CGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTG  
 GTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGT

GGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCT  
GAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAAC  
CACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAA  
AAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGA  
ACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCAC  
CTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAG  
TAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGA  
TCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCGGGGGGGGGGGCGCTGAGG  
TCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATACCAGGCCTGAATCGCCCCATCA  
TCCAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGAC  
CAGTTGGTGATTTTGAACTTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTCGGGAA  
GATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAAGTTCGATTTATTCAACAAAGCCG  
CCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACCAATT  
CTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGG  
ATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCA  
CCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTC  
GTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAAATAAGGTTATCAAG  
TGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAAGCTTATG  
CATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCA  
CTCGCATCAACCAAACCGTTATTTCATTGCGTATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATA  
CGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCA  
GGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAA  
TACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCA  
GGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAG  
TTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTT  
CAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCATAACAATCGATAGATTGTGCGACCT  
GATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGT  
TGGAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCCTTGAATATGGCTCATAAC  
ACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATAT  
TTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGATCATCCA  
GACATGATAAGATAACATTGATGAGTTTGGACAAAACCACAACCTAGAATGCAGTGA  
AAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTAT  
AAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTT  
CAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGT  
ATGGCTGATTATGATCgtcgaggatccggcgTTATCAGACCTTCACCCAGGCGTTGAGGG

TGCGAGGCGAGAGGGCCGCCTTGTGCGACGGTCCTCCGACTCCCTGGCAGGCTGI  
CATCATCTCCTCGAGACCCGCGGCCTGCTCTGCCCTCAGCGTCTTGAAGAAGCGG  
TCTACGTATTTGGCCGCGATGCTGACTGGGCTGTACATCCTGACGATCTTGTTGA  
GGCCAGGATGATCCAGCGCTTGGCTGCAGCCCAGGCGATCTGCTCCTGGAGGG  
TGCTGGTCGTGCCTGCGATGTGCTACCCCTTGGCTCAGCTGCTGCCCTGTCCCAC  
TCGGCTGCCTCCTCGTTGATGGTCTCCTTGAAGCATCTGCATTGCCGCCTGGTGTCC  
ACCGACCGCGGCGTTGAGGTCCTGCGGTGTGCGACCCCTCACTGAGTGCGGTGAAC  
ATGGGGATGACCGAGATCGAGCACGCCACGGTCCCAGTAGCAGGAGCGACTGC  
AGCCACATtcttcggttaaacgctgacagatccaaacGTCCTCCGACGTCCCCAGGCAGAATGG  
CGGTTCCTAAACGAGCATTGCTTATATAGACCTCCCATTAGGCACGCCTACCGC  
CCATTTACGTCAATGGAACGCCATTTGCGTCATTGCCCTCCCCATTGACGTCA  
ATGGGGATGTACTTGGCAGCCATCGCGGGCCATTTACCGCCATTGACGTCAATGG  
GAGTACTGCCAATGTACCCCTGGCGTACTTCCAATAGTAATGTACTTGCCAAGTTA  
CTATTAATAGATATTGATGTACTGCCAAGTGGGCCATTTACCGTCATTGACGTCA  
ATAGGGGGCGTGAGAACGGATATGAATGGGCAATGAGCCATCCCATTGACGTCA  
ATGGTGGGTGGTCCTATTGACGTCAATGGGCATTGAGCCAGGCGGGCCATTTACC  
GTAATTGACGTCAATGGGGGAGGCGCCATATACGTCAATAGGACCGCCCATATG  
ACGTCAATAGGTAAGACCATGAGGCCCTTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACG  
GTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGC  
GGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTG  
TCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCAI  
ATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGATTG  
GCTATTGGCATTATGCC

**SEQ ID NO:18** p24CE1 codificado por SEQ ID NO:17 (incluye un péptido señal GM-CSF)

MWLQSLLLLGTVAC SISVIPMFSALSEGATPQDLNAAVGGHQAAMQMLKDTINEEA  
AEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEIQIWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVD  
RFYKTLRAEQAAGLEEMMTACQGVGGPGHKAISPRTLNAWVKV

5

**SEQ ID NO:19** p24CE2 codificada por SEQ ID NO:17 (incluye un péptido señal GM-CSF)

MWLQSLLLLGTVAC SISVIPMFTALSEGATPQDLNAAVGGHQAAMQMLKETINEEA  
AEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEIQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYSVPSIAAKYVD  
RFFKTLRAEQAAGLEEMMTACQGVGGPSHKAALSPRTLNAWVKV

10

**SEQ ID NO:20** LAMP-p24CE2 (202H) (gen subrayado)

CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCA  
 TGTTCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATC  
 AATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTT  
 ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCA  
 ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAAT  
 GGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT  
 GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTAT  
 GCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAG  
 TCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA  
 GCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGT  
 TTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCC  
 CATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAG  
 CTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCT  
 CCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGggggcgegegtcgactageATGGCGCCC  
CGCAGCGCCCGGCGACCCCTGCTGCTGCTACTGCTGTTGCTGCTGCTCGGCCTCA  
TGCATTGTGCGTCAGCAGCAATGTTTATGGTGAAAAATGGCAACGGGACCGCGT  
GCATAATGGCCAACTTCTCTGCTGCCTTCTCAGTGAACACTACGACACCAAGAGTGG  
CCCTAAGAACATGACCCTTGACCTGCCATCAGATGCCACAGTGGTGCTCAACCGC  
AGCTCCTGTGGAAAAGAGAACACTTCTGACCCAGTCTCGTGATTGCTTTTGGAA  
GAGGACATACTCACTCTCAATTCACGAGAAATGCAACACGTTACAGCGTTCA  
GCTCATGAGTTTTGTTTATAACTTGTGACACACACCTTTTCCCAATGCGAGCT  
CCAAAGAAATCAAGACTGTGGAATCTATAACTGACATCAGGGCAGATATAGATA  
AAAAATACAGATGTGTTAGTGGCACCCAGGTCCACATGAACAACGTGACCGTAA  
CGTCCATGATGCCACCATCCAGGCGTACCTTTCCAACAGCAGCTTCAGCAGGGG  
AGAGACACGCTGTGAACAAGACAGGCCTTCCCCAACCACAGCGCCCCCTGCGCC  
ACCCAGCCCCCTCGCCCTACCCGTGCCAAGAGCCCCCTCTGTGGACAAGTACAAC  
GTGAGCGGCACCAACGGGACCTGCCTGCTGGCCAGCATGGGGCTGCAGCTGAAC  
CTCACCTATGAGAGGAAGGACAACACGACGGTGACAAGGCTTCTCAACATCAAC  
CCCAACAAGACCTCGGCCAGCGGGAGCTGCGGCGCCACCTGGTGACTCTGGAG  
CTGCACAGCGAGGGCACCACCGTCTGCTCTTCCAGTTCGGGATGAATGCAAGTT  
CTAGCCGGTTTTTCTACAAGGAATCCAGTTGAATACAATTCTTCTGACGCCAG  
AGACCCCTGCCTTTAAAGCTGCCAACGGCTCCCTGCGAGCGCTGCAGGCCACAGTC  
GGCAATTCCTACAAGTGCAACGCGGAGGAGCACGTCCGTGTCACGAAGGCGTTT  
TCAGTCAATATATTCAAAGTGTGGGTCCAGGCTTTCAAAGGTGGAAGGTGGCCAGT  
 TTGGCTCTGTGGAGGAGTGTCTGCTGGACGAGAACAGCCTCGAGGATATCGTCAT

CCCGATGTTACGGCGCTCAGCGAGGGAGCGACGCCGCAGGACCTGAACGCGGC  
CGTCGGAGGTACCAGGCAGCGATGCAGATGCTGAAGGAGACGATCAACGAGG  
AGGCGGCCGAGTGGGACCGGGCGGCAGCCGAGCCACGCGGTTCCGACATCGCGG  
GCACCACCTCGACGCTCCAGGAGCAGATCGCGTGGGCCGCAGCTAAGCGCTGGA  
TCATCCTCGGGCTGAACAAGATCGTCCGGATGTACAGCCCGGTCTCGATCGCTGC  
TAAGTACGTTGACCGGTTCTTCAAGACCCTGAGGGCCGAGCAGGCGGCCGGACT  
GGAGGAGATGATGACCGCGTGCCAGGGGGTTCGGTGGACCATCGCACAAGGCCGC  
GCTCTCGCCGCGCACGCTGAACGCGTGGGTGAAGGTTCGGATCCGAATTCACGCT  
GATCCCCATCGCTGTGGGTGGTGCCCTGGCGGGGCTGGTCTCATCGTCTCATC  
GCCTACCTCGTCGGCAGGAAGAGGAGTACGCAGGCTACCAGACTATCTAGggtac  
 etctagGATCTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCCCCCGTG  
 CCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGG  
 AAATTGCATCGCATTGICTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGG  
 GCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATG  
 CGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTTCCTCTGGGC  
 CAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTCTGTGACACACCCTGTCCACGCCCTGG  
 TTCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGGCTCCGCCTT  
 CAATCCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACC  
 AAACCAAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTA  
 AGTGCAGAGGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAAT  
 CATAGAATTTCTTCCGTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCT  
 GCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATC  
 AGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGA  
 ACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGA  
 GCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATA  
 AAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACC  
 CTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTC  
 TCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTG  
 GGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACT  
 ATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCAC  
 TGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAA  
 GTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTG  
 CTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAA  
 ACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAA  
 AAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTG

GAACGAAAACACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC  
 ACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATG  
 AGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGC  
 GATCTGTCTATTTTCGTTCCATAGTTGCCTGACTCGGGGGGGGGGGGGCGCTG  
 AGGCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATACCAGGCCTGAATCGCCCCA  
 TCATCCAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTG  
 GACCAGTTGGTGATTTTGAACTTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTCGG  
 GAAGATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAGTTCGATTTATTCAACAAAG  
 CCGCCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACCA  
 ATTCTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTTCATATC  
 AGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAAAC  
 TCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGA  
 CTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATC  
 AAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTT  
 ATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAA  
 TCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAA  
 ATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGC  
 GCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTC  
 TAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCA  
 TCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGC  
 CAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATG  
 TTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCCGA  
 CCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCA  
 TGTTGGAATTTAATCGCGGCCTGGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCAT  
 AACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTATTGTTTCATGATGATA  
 TATTTTATCTTGTCGAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTCC  
 CCCCCCCCCATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATAACA  
 TATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCG  
 AAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAA  
 AATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGGTTTCGGTGATGACGGTGAAA  
 ACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGC  
 CGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGG  
 CTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGG  
 TGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGATTGGCTATT  
 GG

MAPRSARRPLLLLLLLLLLLLLGLMHCCASAAMFMVKNNGTACIMANFSAAFSVNYDT  
KSGPKNMTLDLPSDATVVLNRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGHTLTLNFTRNATRYSV  
QLMSFVYNLSDLHLPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVTL  
HDATIQAAYLSNSSFSRGETRCEQDRPSPTTAPPAPPSPSPSPVPKSPSVDKYNVSGTNG  
TCLLASMGLQLNLTYERKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAHLVTLELHSEGTTVL  
LFQFGMNASSSRFFLQGIQLNTILPDARDPAFKAANGSLRALQATVGNSYKCNAAEH  
VRVTKAFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENSLEDIVIPMFTALSEGATPO  
DLNAAVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEQIAWAAA  
KRWIILGLNKIVRMYSVSIKAYVDRFFKTLRAEQAAGLEEMMTACQGVGGPSHK  
AALSPRTLNAWVKVGSEFTLIPIAVGGALAGLVLIVLIAAYLVGRKRSHAGYQTL

**SEQ ID NO:21** fusión LAMP-p24CE2 (p24CE2 subrayado) codificada por SEQ ID NO:20  
**SEQ ID NO:22** LAMP-p24CE1 (191H) (gen subrayado)

5

CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCA  
TGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATC  
AATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTT  
ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCA  
ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAAT  
GGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT  
GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTAT  
GCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAG  
TCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA  
GCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGT  
TTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAATGTCGTAACAACCTCCGCC  
CATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAG  
CTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCT  
CCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGggggcgcgcgctgactagcATGGCGCCC  
CGCAGCGCCCGGCGACCCCTGCTGCTGCTACTGCTGTTGCTGCTGCTCGGCCTCA  
TGCATTGTGCGTCAGCAGCAATGTTTTATGGTGAAAAATGGCAACGGGACCGCGT  
GCATAATGGCCAACTTCTCTGCTGCCTTCTCAGTGAACCTACGACACCAAGAGTGG  
CCCTAAGAACATGACCCTTGACCTGCCATCAGATGCCACAGTGGTGCTCAACCGC  
AGCTCCTGTGGAAAAGAGAACACTTCTGACCCAGTCTCGTGATTGCTTTTGGAA  
GAGGACATACTACTCTCAATTTACGAGAAATGCAACACGTTACAGCGTTCA  
GCTCATGAGTTTTGTTTATAACTTGTGACACACACCTTTTCCCAATGCGAGCT

CCAAAGAAATCAAGACTGTGGAATCTATAACTGACATCAGGGCAGATATAGATA  
AAAAATACAGATGTGTTAGTGGCACCCAGGTCCACATGAACAACGTGACCGTAA  
CGCTCCATGATGCCACCATCCAGGCGTACCTTTCCAACAGCAGCTTCAGCAGGGG  
AGAGACACGCTGTGAACAAGACAGGCCTTCCCAACCACAGCGCCCCCTGCGCC  
ACCCAGCCCCTCGCCCTACCCGTGCCAAGAGCCCCCTCTGTGGACAAGTACAAC  
GTGAGCGGCACCAACGGGACCTGCCTGCTGGCCAGCATGGGGCTGCAGCTGAAC  
CTCACCTATGAGAGGAAGGACAACACGACGGTGACAAGGCTTCTCAACATCAAC  
CCCAACAAGACCTCGGCCAGCGGGAGCTGCGGCGCCACCTGGTGACTCTGGAG  
CTGCACAGCGAGGGCACCACCGTCTGCTCTTCCAGTTCGGGATGAATGCAAGTT  
CTAGCCGGTTTTTCCCTACAAGGAATCCAGTTGAATACAATTCTTCTGACGCCAG  
AGACCCTGCCTTTAAAGCTGCCAACGGCTCCCTGCGAGCGCTGCAGGCCACAGTC  
GGCAATTCCTACAAGTGCAACGCGGAGGAGCACGTCCGTGTCACGAAGGCGTTT  
TCAGTCAATATATTCAAAGTGTGGGTCCAGGCTTCAAGGTGGAAGGTGGCCAGT  
TTGGCTCTGTGGAGGAGTGTCTGCTGGACGAGAACAGCCTCGAGGATATCGTCAT  
CCCGATGTTCTCGGCGCTCAGCGAGGGAGCGACGCCGCAGGACCTGAACGCGGC  
CGTCGGAGGTCACCAGGCAGCGATGCAGATGCTGAAGGACACGATCAACGAGGA  
GGCGGCCGAGTGGGACCGGGCGGCAGCCGAGCCACGCGGTTCCGACATCGCGGG  
CACCACCTCGACGCTCCAGGAGCAGATCGGGTGGGCCGAGCTAAGCGCTGGAT  
CATCCTCGGGCTGAACAAGATCGTCCGGATGTACAGCCCGACGTCGATCGCTGCT  
AAGTACGTTGACCGGTTCTACAAGACCCTGAGGGCCGAGCAGGCGGCCGACTG  
GAGGAGATGATGACCGGTGCCAGGGGGTCCGGTGGACCAGGGCACAAGGCCGC  
GATCTCGCCGCGCACGCTGAACGCGTGGGTGAAGGTCGGATCCGAATTCACGCT  
GATCCCCATCGCTGTGGGTGGTGCCCTGGCGGGGCTGGTCCCTCATCGTCTCATC  
GCCTACCTCGTCGGCAGGAAGAGGAGTCACGCAGGCTACCAGACTATCTAGggtac  
ctetagGATCTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCCGT  
CCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGG  
AAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGG  
GCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATG  
CGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGC  
CAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCTTCTCTGTGACACACCCTGTCCACGCCCCCTGG  
TTCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTT  
CAATCCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACC  
AAACCAAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTA  
AGTGCAGAGGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAAT  
CATAGAATTTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGTTCCGGCT

GCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATC  
AGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGA  
ACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGA  
GCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATA  
AAGATAACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACC  
CTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTC  
TCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTG  
GGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACT  
ATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCAC  
TGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAA  
GTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTG  
CTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAA  
ACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAA  
AAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTG  
GAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC  
ACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATG  
AGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGC  
GATCTGTCTATTTGTTTCCATAGTTGCTGACTCGGGGGGGGGGGGGCGCTG  
AGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATAACCAGGCCTGAATCGCCCCA  
TCATCCAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTG  
GACCAGTTGGTGATTTTGAACCTTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTCGG  
GAAGATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAGTTGATTTATTCAACAAAG  
CCGCCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACCA  
ATTCTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAAATGAACTGCAATTTATTCATATC  
AGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAAC  
TCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGA  
CTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATC  
AAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTT  
ATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTC AACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAA  
TCACTCGCATCAACCAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAA  
ATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGC  
GCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTC  
TAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCA  
TCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGC  
CAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATG

TTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATAACAATCGATAGATTGTCGCA  
CCTGATTGCCCCGACATTATCGCGAGCCATTATACCCATATAAATCAGCATCCA  
TGTTGGAATTTAATCGCGGCCTGGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCAT  
AACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATA  
TATTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTCC  
CCCCCCCCCATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATAACA  
TATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCG  
AAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAA  
AATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAA  
ACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGC  
CGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGG  
CTGGCTTA ACTATGCGGCATCAGAGCAGATTG TACTGAGAGTGCACCATATGCGC  
TGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGATTGGCTATT

**SEQ ID NO:23** LAMP-p24CE1 (p24CE1 subrayado)

MAPRSARRPLLLLLLLLLLGLMHCASAAMFMVKNNGTACIMANFSAAFSVNYDT  
KSGPKNMTLDLPSDATVVLNRSSCGKENTS DPSLVIAFGRGHTLTLNFTRNATRYSV  
QLMSFVYNLS DTHLFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVTL  
HDATI QAYLSNSSFSRGETRCEQDRPSPTTAPPAPSPSPVPKSPSVDKYNVSGTNG  
TCLLASMGLQLNLTYERKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAHLVTLELHSEGTTVL  
LFQFGMNASSSRFFLQGIQLNTILPDARDPAFKAANGSLRALQATVGNSYKCNAAEEH  
VRVTKAFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENSLEDIVIPMFSALEGATPQ  
DLNAAVGGHQAA MQMLKDTINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEQIGWAAA  
KRWIILGLNKIVRMYSPSIAAKYVDRFYKTLRAEQAAGLEEMMTACQGVGGPQGHK  
5 AAISPRTLNAWVKVGVSEFTLIPIAVGGALAGLVLIVLIAYL VGRKRSHAGYQTI.

**SEQ ID NO:24** SP-p24CE2 (235H) (gen subrayado)

CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCA  
TGTTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATC  
AATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTT  
ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCA  
ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAAT  
GGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT  
GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTAT

10

GCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAG  
 TCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA  
 GCGGTTTGACTCACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGT  
 TTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCC  
 CATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAG  
 CTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCT  
 CCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGGGegcegegcgacaagaaATGTGGC  
TCCAGAGCCTGCTACTCCTGGGGACGGTGGCCTGCAGCATCTCGGTCAATCCCGAT  
GTTACGCGCTCAGCGAGGGAGCGACGCCGAGGACCTGAACGCGGCCGTCGG  
AGGTCACCAGGCAGCGATGCAGATGCTGAAGGAGACGATCAACGAGGAGGCGG  
CCGAGTGGGACCGGGCGGCAGCCGAGCCACGCGGTTCCGACATCGCGGGCACCA  
CCTCGACGCTCCAGGAGCAGATCGCGTGGGCCGAGCTAAGCGCTGGATCATCC  
TCGGGCTGAACAAGATCGTCCGGATGTACAGCCCGGTCTCGATCGCTGCTAAGTA  
CGTTGACCGGTTCTTCAAGACCCTGAGGGCCGAGCAGGCGGCCGACTGGAGGA  
GATGATGACCGCTGCCAGGGGGTCGGTGGACCATCGCACAAGGCCGCGCTCTC  
GCCGCGCACGCTGAACGCGTGGGTGAAGGTCTGATAAgaattegcggatateggtaacggatcc  
 AGATCTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCC  
 TTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAA  
 ATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGC  
 AGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCG  
 GTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTTCCTCTGGGCCA  
 GAAAGAAGCAGGCACATCCCCTTCTCTGTGACACACCCTGTCCACGCCCCTGTT  
 CTTAGTTCCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA  
 ATCCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAA  
 ACCAAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAG  
 TGCAGAGGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAATCAT  
 AGAATTTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCG  
 GCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGG  
 GGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACC  
 GTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCA  
 TCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAG  
 ATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCTGC  
 CGTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAT  
 AGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCT  
 GTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCG

TCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGT  
AACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGG  
TGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGA  
AGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCA  
CCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAA  
AGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAAC  
GAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCT  
AGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTA  
AACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATC  
TGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCGGGGGGGGGGGCGCTGAGGTC  
TGCCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATAACCAGGCCTGAATCGCCCCATCATC  
CAGCCAGAAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGGTGGACCA  
GTTGGTGATTTTGAAC TTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTCGGGAAGA  
TGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAGTTTCGATTTATTCAACAAAGCCGCC  
GTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACCAATTCT  
GATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGAT  
TATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACCTACC  
GAGGCAGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGT  
CCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTG  
AGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAGCTTATGCA  
TTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTC  
GCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGC  
GATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCAGGA  
ACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATAC  
CTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGA  
GTACGGATAAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTT  
AGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTICAG  
AAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTGCGACCTGAT  
TGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCATATAAATCAGCATCCATGTTGG  
AATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACC  
CCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTT  
TATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTCCCCCCC  
CCCCCATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTG  
AATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAG  
TGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAG

GCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTC  
TGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGG  
AGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGG  
CTTA ACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTC  
AAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGATTGGCTATTGG

**SEQ ID NO:25** SP-p24CE2 (p24CE1 subrayado) codificado por SEQ ID NO:24

MWLQSLLLLGTVAC SISVIPMFTALSEGATPQDLNAAVGGHQAA MQMLKETINEEA  
AEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYSVPSIAAKYVI  
RFFKTLRAEQAAAGLEEMMTACQGVGGPSHKAALSPRTLNAWKV

5

**SEQ ID NO:26** MCP3-p24CE1 (230H) (gen subrayado)

CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCA  
TGTC AACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATC  
AATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTT  
ACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCA  
ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAAT  
GGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT  
GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGCCCGCTGGCATTAT  
GCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAG  
TCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA  
GCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGT  
TTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACA ACTCCGCC  
CATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAG  
CTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCT  
CCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGGGcgcgctcgacaagaaATGTGG  
AAGCCGATGCCCTCGCCAAGCAACATGAAGGCGTCCGCCGCGCTCCTGTGCCTGC  
TCCTCACGGCCGCGGCTTTCAGCCCCAGGGGCTCGCGCAGCCGGTTCGGGATCAA  
CACGAGCACGACCTGCTGCTACCGGTTTCATCAACAAGAAGATCCCGAAGCAGCG  
TCTGGAGAGCTACCGCCGACCACGTGAGCCACTGCCC GCGGGAGGCGGTCAT  
CTTCAAGACGAAGCTGGACAAGGAGATCTGCGCCGACCCGACGCAGAAGTGGGT  
TCAGGACTTCATGAAGCACCTGGACAAGAAGACGCAGACGCCGAAGCTGGTCAT  
CCC GATGTTCTCGGCGCTCAGCGAGGGAGCGACCCGACGACCTGAACGCGGC  
CGTCGGAGGTCACCAGGCAGCGATGCAGATGCTGAAGGACACGATCAACGAGGA  
GGCGGCCGAGTGGGACCGGGCGGCAGCCGAGCCACGCGGTTCCGACATCGCGGG

CACCACCTCGACGCTCCAGGAGCAGATCGGGTGGGCCCGCAGCTAAGCGCTGGAT  
CATCCTCGGGCTGAACAAGATCGTCCGGATGTACAGCCCGACGTCGATCGCTGCT  
AAGTACGTTGACCGGTTCTACAAGACCCTGAGGGCCGAGCAGGCGGCCGACTG  
GAGGAGATGATGACCGCGTGCCAGGGGGTTCGGTGGACCAGGGCA CAAGGCCGC  
GATCTCGCCGCGCACGCTGAACGCGTGGGTGAAGGTCTGATAAgaattecgatateggtt  
aacggatccaGATCTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCC  
GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCTAATAAAAATG  
AGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGT  
GGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGG  
ATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTTCCTCCTG  
GGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCTTCTCTGTGACACACCCTGTCCACGCCCC  
TGGTCTTAGTTCCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGC  
CTTCAATCCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCC  
ACCAAACCAAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTA  
TTAAGTGCAGAGGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGA  
AATCATAGAATTTCTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTTG  
GCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGA  
ATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCA  
GGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGA  
CGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACT  
ATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCGG  
ACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGC  
TTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAG  
CTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTA  
ACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGC  
CACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTT  
GAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCT  
CTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAC  
AAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAG  
AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAG  
TGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATC  
TTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATAT  
ATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTC  
AGCGATCTGTCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCGGGGGGGGGGGCGC  
TGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATAACCAGGCCTGAATCGCCC

SEQ ID NO:27 MCP3-p24CE1 (p24CE1 subrayado) codificado por SEQ ID NO:26

MWKPMPSPSNMKASAALLCLLLTAAAFSPQGLAQPVGINTSTTCCYRFINKKIPKQR  
LESYRRRTTSSHCPREAVIFKTKLDKEICADPTQKWVQDFMKHLDKKTQTPKL  
VIPMFSALSEGATPQDLNAAVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAC  
TTSTLQEQIGWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQAAGLEEM  
MTACQGVGGPGHKAISPRTLNAWVKV..

5 **SEQ ID NO:28** MCP3-p24CE2 (231H) (gen subrayado)

CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCA  
TGTC AACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATC  
AATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTT  
ACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCA  
ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAAT  
GGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT  
GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTAT  
GCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAG  
TCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA  
GCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGT  
TTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAATGTCGTAACA ACTCCGCCC  
CATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAG  
CTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCT  
CCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGGGcgcgcgtcgacaagaaATGTGG  
AAGCCGATGCCCTCGCCAAGCAACATGAAGGCGTCCGCCGCGCTCCTGTGCCTGC  
TCCTCACGGCCGCGGCTTTCAGCCCCAGGGGCTCGCGCAGCCGGTTCGGGATCAA  
CACGAGCACGACCTGCTGCTACCGGTTTCATCAACAAGAAGATCCCCAAGCAGCG  
TCTGGAGAGCTACCGCCGGACCACGTCGAGCCACTGCCCGCGGGAGGCGGTCAT  
CTTCAAGACGAAGCTGGACAAGGAGATCTGCGCCGACCCGACGCAGAAGTGGGT  
TCAGGACTTCATGAAGCACCTGGACAAGAAGACGCAGACGCCGAAGCTGGTCAT  
CCCGATGTTACGGCGCTCAGCGAGGGAGCGACGCCGCAGGACCTGAACGCGGC  
CGTCGGAGGTCACCAGGCAGCGATGCAGATGCTGAAGGAGACGATCAACGAGG  
AGGCGGCCGAGTGGGACCGGGCGGCAGCCGAGCCACGCGGTTCCGACATCGCGG  
GCACCACCTCGACGCTCCAGGAGCAGATCGCGTGGGCCGAGCTAAGCGCTGGA  
TCATCCTCGGGCTGAACAAGATCGTCCGGATGTACAGCCCGGTTCTCGATCGCTGC  
TAAGTACGTTGACCGGTTCTTCAAGACCTGAGGGCCGAGCAGGCGGCCGGACT  
GGAGGAGATGATGACCGCGTGCCAGGGGGTTCGGTGGACCATCGCACAAAGCCGC  
GCTCTCGCCGCGCACGCTGAACGCGTGGGTGAAGGTCTGATAAgaattcgcgatcggtt  
aacgatccaGATCTGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCC  
GTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATG

AGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGT  
 GGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGG  
 ATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTTCCTCCTG  
 GGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCTTCTCTGTGACACACCCTGTCCACGCCCC  
 TGGTTCTTAGTTCCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGGCTCCGC  
 CTTCAATCCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCC  
 ACCAAACCAAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTA  
 TTAAGTGCAGAGGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGA  
 AATCATAGAATTTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGTCG  
 GCTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGA  
 ATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCA  
 GGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGA  
 CGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACT  
 AATAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCG  
 ACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGC  
 TTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAG  
 CTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTA  
 ACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGC  
 CACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTT  
 GAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCT  
 CTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAC  
 AAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACCGCGAG  
 AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAG  
 TGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATC  
 TTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATAT  
 ATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTC  
 AGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCGGGGGGGGGGGCGC  
 TGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATACCAGGCCTGAATCGCCC  
 CATCATCCAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGG  
 TGGACCAGTTGGTGATTTTGAAC TTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTG  
 GGAAGATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAGTTCGATTTATTCAACAAA  
 GCCGCCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACC  
 AATTCTGATTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATAT  
 CAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAA  
 CTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCG

AGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGT  
GGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGG  
ATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTTCCTCTG  
GGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCTTCTCTGTGACACACCCTGTCCACGCCCC  
TGGTTCTTAGTTCCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGC  
CTTCAATCCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCC  
ACCAAACCAAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTA  
TTAAGTGCAGAGGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGA  
AATCATAGAATTTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCG  
GCTGCGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGA  
ATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAGGCCA  
GGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGA  
CGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACT  
ATAAGATAACCAGGCGTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCG  
ACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGC  
TTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGCTCCAAG  
CTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCCACCGCTGCGCCTTATCCGGTA  
ACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGC  
CACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTT  
GAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCT  
CTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAC  
AAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAG  
AAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAG  
TGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATC  
TTCACCTAGATCCTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATAT  
ATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTC  
AGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCGGGGGGGGGGGCGC  
TGAGGTCTGCCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATAACCAGGCCTGAATCGCCC  
CATCATCCAGCCAGAAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGTAGG  
TGGACCAGTTGGTGATTTTGAACTTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCGTTGTGCG  
GGAAGATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAGTTCGATTTATTCAACAAA  
GCCGCCGTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTTACAACCAATTAACC  
AATTCTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTATAT  
CAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAA  
CTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCG

SEQ ID NO:29 MCP3-p24CE2 (p24CE2 está subrayado) codificado por SEQ ID NO:28

MWKPMSPSNMKASAALLCLLLTAAAFSPQGLAQPVGINTSTTCCYRFINKKIPKQR  
LESYRRTTSSHCPREAVIFKTKLDKEICADPTQKWVQDFMKHLDKKTQTPKL  
VIPMFTALSEGATPQDLNAAVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAC  
TTSTLQEQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVDRFFKTLRAEQAAGLEEM  
MTACQGVGGPSHKAALSPRTLNAWVKV.

**SEQ ID NO:30** construcción alternativa de ácido nucleico de elemento conservado PS-p24CE1c

5 ATGTGGCTCCAGAGCCTGCTACTCCTGGGGACGGTGGCCTGCAGCATCTCGCAGC  
GGCAGATGGTCCACCAGGCGATCTCGCCGCGCACGCTGAACGCGTGGGTGAAGG  
TCCTGGCGAAGGAGGAGAAGGCGTTCAGCCCGGAGGTCATCCCGATGTTCTCGG  
CGCTCAGCGAGGGAGCGACGCCGACGACCTGAACGCGGCCAAGGTCGGAGGTC  
ACCAGGCAGCGATGCAGATGCTGAAGGAGACGATCAACGAGGAGGCGGCCGAG  
TGGGACCGGGCGGCAGCCGAGCCACGCGGTTCCGACATCGCGGGCACCACCTCG  
ACGCTCCAGGAGCAGATCGGGTGGGCCGACGCTAAGCGCTGGATCATCCTCGGG  
CTGAACAAGATCGTCCGGATGTACAGCCCGACGTCGATCGCTGCTAAATACGTT  
ACCGGTTCTACAAGACCCTGAGGGCCGAGCAGGCGGATTACAAGGACGATGACG  
ACAAGCTGTGATAA

10 **SEQ ID NO:31** PS-p24CE1c (p24CE1c subrayado) codificada por SEQ ID NO:30. Incluye péptido señal GM-CSF, CE1 y CE2 reemplazados por CE8 y CE9, respectivamente (en relación con p24 CE "Nucleocápside1"); carece de CE7; dispuestos en la configuración de elementos conservados: CE 8-9-3-4-5-6

MWLQSLLLLGTVACSSISQGMVHQAISPRTLNAWVKVLAKEEKAFSPEVPMFSALS  
EGATPQDLNAAKVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQE  
QIGWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQADYKDDDDKL

15 **SEQ ID NO:32** elemento conservado 8 (CE8)  
QGQMVHQAI SPRTLNA WVKV

**SEQ ID NO:33** elemento conservado 9 (CE9)  
EEKAFSPEVPMFSALSEGATPQDLN

20 **SEQ ID NO:34** PS-p24CE2c-alternativo

ATGTGGCTCCAGAGCCTGCTACTCCTGGGGACGGTGGCCTGCAGCATCTCGCAGC  
GGCAGATGGTCCACCAGGCGCTGTCCGCCGCGCACGCTGAACGCGTGGGTGAAGG  
TCCTGGCGAAGGAGGAGAAGGGGTTCAACCCGGAGGTCATCCCGATGTTACGG  
CGCTCAGCGAGGGAGCGACGCCGACGACCTGAACGCGGCCAAGGTCCGAGGTC  
ACCAGGCAGCGATGCAGATGCTGAAGGACACGATCAACGAGGAGGCGGCCGAG  
TGGGACCGGGCGGCAGCCGAGCCACGCGGTTCCGACATCGCGGGCACCACCTCG  
ACGCTCCAGGAGCAGATCGCGTGGGCCGAGCTAAGCGCTGGATCATCCTCGGG  
CTGAACAAGATCGTCCGGATGTACAGCCCGGTCTCGATCGCTGCTAAATACGTTG  
ACCGGTTCTTCAAGACCCTGAGGGCCGAGCAGGCGTGATAA

**SEQ ID NO:35** PS-p24CE2c (p24CE2c subrayado)

MWLQSLLLLGTVAC SISQGMVHQALSPRTLNAWVKVLAKEEKGFNPEVIPMFTAL  
SEGATPQDLNAAKVGGHQAMQMLKDTINEEAAEWDRAAAEP RGS DIAGTTSTLQ  
EQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYSVIAAKYVDRFFKTLRAEQA

5

**SEQ ID NO:36** construcción de ácido nucleico de elemento conservado de ácido nucleico alternativo SP-p24CE2d; en orden CE9-3-4-5-6-8

ATGTGGCTCCAGAGCCTGCTACTCCTGGGGACGGTGGCCTGCAGCATCTCGGAGC  
AGAAGGGGTTCAACCCGGAGGTCATCCCGATGTTACGGCGCTCAGCGAGGGAG  
CGACGCCGACGACCTGAACGCGGCCAAGGTCCGAGGTCACCAGGCAGCGATGC  
AGATGCTGAAGGACACGATCAACGAGGAGGCGGCCGAGTGGGACCGGGCGGCA  
GCCGAGCCACGCGGTTCCGACATCGCGGGCACCACCTCGACGCTCCAGGAGCAG  
ATCGCGTGGGCCGAGCTAAGCGCTGGATCATCCTCGGGCTGAACAAGATCGTC  
CGGATGTACAGCCCGGTCTCGATCGCTGCTAAATACGTTGACCGGTTCTTCAAGA  
CCCTGAGGGCCGAGCAGGCGGCGCTGCAGGGGCAGATGGTCCACCAGGCGCTGT  
CGCCGCGCACGCTGAACGCGTGGGTGAAGGTCTGATAA

10

**SEQ ID NO:37** p24CE2d (proteína subrayada) codificada por SEQ ID NO:36

MWLQSLLLLGTVAC SISEEKGFNPEVIPMFTALSEGATPQDLNAAKVGGHQAMQM  
LKDTINEEAAEWDRAAAEP RGS DIAGTTSTLQEQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYS  
VSIAAKYVDRFFKTLRAEQAALQGOMVHQALSPRTLNAWVKV

15

**SEQ ID NO:38** construcción de ácido nucleico de elemento conservado SP-24CE1d; en orden CE9-3-4-5-6-8

ATGTGGCTCCAGAGCCTGCTACTCCTGGGGACGGTGGCCTGCAGCATCTCGGAGC  
AGAAGGCGTTCAGCCCGGAGGTCATCCCGATGTTCTCGGCGCTCAGCGAGGGAG  
CGACGCCGCAGGACCTGAACGCGGCCAAGGTCGGAGGTCACCAGGCAGCGATGC  
AGATGCTGAAGGAGACGATCAACGAGGAGGCGGCCGAGTGGGACCGGGCGGCA  
GCCGAGCCACGCGGTTCCGACATCGCGGGCACACCTCGACGCTCCAGGAGCAG  
ATCGGGTGGGCCGAGCTAAGCGCTGGATCATCCTCGGGCTGAACAAGATCGTC  
CGGATGTACAGCCCGACGTCGATCGCTGCTAAATACGTTGACCGGTTCTACAAGA  
CCCTGAGGGCCGAGCAGGCGGCGCTGCAGGGGCAGATGGTCCACCAGGCGATCT  
CGCCGCGCACGCTGAACGCGTGGGTGAAGGTCTGATAA

**SEQ ID NO:39** SP-p24CE1c codificada por SEQ ID NO:38

MWLQSLLLLGTVACSISEEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNAAKVGGHQAAMQM  
LKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEIQGWAAAKRWIILGLNKIVRMYS  
5 TSIAAKYVDRFYKTLRAEQAALQGQMVHQAI SPRTLNAWVKV

p24CE1d tiene 6 CE (es idéntica a p24CE1c excepto por la disposición de CE en la proteína)  
péptido señal GM-CSF

10 CE1 y C2 reemplazados por CE8 y CE9 respectivamente, carece de CE7 y tiene el CE dispuesto en la configuración  
CE9-3-4-5-6-8

**SEQ ID NO:40** elemento conservado 8 (variante CE8 para construcciones de CE2)  
QGQMVHQALSPRTLNA WVKV

15 **SEQ ID NO:41** elemento conservado 9 (CE9)  
EEKGFNPEVIPMFTALSEGATPQDLN

Las diferencias entre los CE para los polipéptidos p24 CE y los polipéptidos p24CE variantes es de un aminoácido por  
CE excepto CE9, que difiere en 3 aminoácidos

20

## REIVINDICACIONES

1. Un primer y segundo ácido nucleico de elemento conservado de *gag* y un ácido nucleico que codifica una proteína p55<sup>Gag</sup> del VIH de longitud completa para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, comprendiendo el método
- 5 administrar al sujeto el primer ácido nucleico de elemento conservado de *gag*, que codifica un primer polipéptido de elemento conservado de p24<sup>Gag</sup> del VIH-1 que comprende siete elementos conservados de p24<sup>Gag</sup> del VIH-1, en el que cada uno de los elementos conservados tiene una secuencia expuesta en las SEQ ID NO: 1-7; y los elementos conservados no son contiguos y están unidos por secuencias peptídicas enlazadoras;
- 10 administrar el segundo ácido nucleico de elemento conservado de *gag*, que codifica un segundo polipéptido de elemento conservado de p24<sup>Gag</sup> del VIH-1 que comprende los elementos conservados expuestos en las SEC ID NO: 8-14; y
- 15 administrar el ácido nucleico que codifica la proteína p55<sup>Gag</sup> del VIH de longitud completa, en el que el ácido nucleico que codifica la proteína p55<sup>Gag</sup> del VIH de longitud completa se administra después del primer y segundo ácido nucleico de elemento conservado de *gag*.
2. El primer y segundo ácido nucleico de elemento conservado de *gag* y el ácido nucleico que codifica la proteína p55<sup>Gag</sup> del VIH de longitud completa para su uso en el método de la reivindicación 1, en el que el primer ácido nucleico de elemento conservado de *gag* codifica un polipéptido de elemento conservado de p24<sup>Gag</sup> del VIH-1 que comprende la secuencia de SEC ID NO: 15 y el segundo ácido nucleico de elemento conservado de *gag* codifica un polipéptido de elemento conservado de p24<sup>Gag</sup> del VIH-1 que comprende la secuencia de SEC ID NO: 16.
3. El primer y segundo ácido nucleico de elemento conservado de *gag* y el ácido nucleico que codifica la proteína p55<sup>Gag</sup> del VIH de longitud completa para su uso en el método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que:
- 25 (a) el primer y segundo ácido nucleico de elemento conservado de *gag* se administran secuencialmente; o  
(b) el primer y segundo ácido nucleico de elemento conservado de *gag* se administran simultáneamente.
4. El primer y segundo ácido nucleico de elemento conservado de *gag* y el ácido nucleico que codifica la proteína p55<sup>Gag</sup> del VIH de longitud completa para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que cada uno de los polipéptidos de elemento conservado codificado por el primer y segundo ácido nucleico de los ácidos nucleicos de elemento conservado de *gag*, se fusiona con un péptido señal GM-CSF.
- 30 5. El primer y segundo ácido nucleico de elemento conservado de *gag* y el ácido nucleico que codifica la proteína p55<sup>Gag</sup> del VIH de longitud completa para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que:
- 35 (a) el primer y segundo ácido nucleico de los ácidos nucleicos de elemento conservado de *gag* están contenidos en el mismo vector; o  
(b) el primer y segundo ácido nucleico de los ácidos nucleicos de elemento conservado de *gag* están contenidos en vectores diferentes.
- 40 6. El primer y segundo ácido nucleico de elemento conservado de *gag* y el ácido nucleico que codifica la proteína p55<sup>Gag</sup> del VIH de longitud completa para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que las construcciones de ácido nucleico se administran por vía intramuscular mediante electroporación *in vivo*.
- 45 7. El primer y segundo ácido nucleico de elemento conservado de *gag* y el ácido nucleico que codifica la proteína p55<sup>Gag</sup> del VIH de longitud completa para su uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que cada elemento conservado consiste en una secuencia de aminoácidos de 12-30 aminoácidos de longitud.
- 50 8. Un agente seleccionado de:
- (i) un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 15 y un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEC ID NO: 16; o
- 55 (ii) un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de

QGQMVIIQAISPRTLNAWVKVLAKEEKAFSPEVPMFSALSEGATPQDLNAAKVGIIQA  
 AMQMLKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEQIGWAAAKRWIILGLNKIVRM  
 YSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQA

60 y un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de

QGQMVHQAI SPRTLNAWVKVLAKEEKAFSPEVPMFSALSEGATPQDLNAAKVGGHQA  
 AMQMLKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEIQIGWAAAKRWIILGLNKIVRM  
 YSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQA

o  
 (iii) un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de  
 5 EEKAFSPEVPMFSALSEGATPQDLNAAKVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRAAAE  
 RGS DIAGTTSTLQEIQIGWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQAAL QGQMVHQAI-  
 PRTLNAWVKV y un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de

EEKGFNPEVPMFTALSEGATPQDLNAAKVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRAAAE  
 PRGSDIAGTTSTLQEIQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYS PVSIAAKYVDRFFKTLRAEQAA  
 10 LQGQMVHQALSPRTLNAWVKV,

y un ácido nucleico que codifica a p55<sup>Gag</sup>  
 para su uso en un método de inducción de una respuesta inmunitaria contra una proteína Gag del VIH,  
 comprendiendo el método

- 15 (a) administrar (i), (ii) o (iii) y  
 (b) administrar el ácido nucleico que codifica la proteína p55<sup>Gag</sup> después de administrar (i), (ii) o (iii).

9. El agente y el ácido nucleico que codifica la proteína p55<sup>Gag</sup> para su uso en el método de la reivindicación 8, en el  
 que:

- 20 (a) el polipéptido de SEQ ID NO: 15 y el polipéptido de SEQ ID NO: 16; o el polipéptido de  
 QGQMVHQAI SPRTLNAWVKVLAKEEKAFSPEVPMFSALSEGATPQDLNAAKVGGHQA  
 AMQMLKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEIQIGWAAAKRWIILGLNKIVRM  
 25 YSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQA y el polipéptido de  
 QGQMVHQALSPRTLNAWVKVLAKEEKGFNPEVPMFTALSEGATPQDLNAAKVGGHQ  
 AAMQMLKDTINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEIQIAWAAAKRWIILGLNKIVR  
 MYSPVSIAAKYVDRFFKTLRAEQA; o el polipéptido de  
 EEKAFSPEVPMFSALSEGATPQDLNAAKVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRAAAE  
 RGS DIAGTTSTLQEIQIGWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQAAL  
 30 QGQMVHQAI SPRTLNAWVKV y el polipéptido de  
 EEKGFNPEVPMFTALSEGATPQDLNAAKVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRAAAE  
 PRGSDIAGTTSTLQEIQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYS PVSIAAKYVDRFFKTLRAEQAA  
 LQGQMVHQALSPRTLNAWVKV están codificados por el mismo vector; y/o  
 35 (b) el polipéptido de SEQ ID NO: 15 y el polipéptido de SEQ ID NO: 16; o el polipéptido de

QGQMVHQAI SPRTLNAWVKVLAKEEKAFSPEVPMFSALSEGATPQDLNAAKVGGHQA  
 AMQMLKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEIQIGWAAAKRWIILGLNKIVRM  
 YSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQA

y el polipéptido de

QGQMVHQALSPRTLNAWVKVLAKEEKGFNPEVPMFTALSEGATPQDLNAAKVGGHQ  
 AAMQMLKDTINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEIQIAWAAAKRWIILGLNKIVR  
 40 MYSPVSIAAKYVDRFFKTLRAEQA;

o el polipéptido de

EEKAFSPEVPMFSALSEGATPQDLNAAKVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRAAAE  
 RGS DIAGTTSTLQEIQIGWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQAAL  
 QGQMVHQAI SPRTLNAWVKV

y

EEKGFNPEVIPMFTALSEGATPQDLNAAKVGGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRAAAE  
PRGSDIAGTTSTLQEQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYSIVSIAAKYVDRFFKTLRAEQAA  
LQGQMVHQALSPRTLNAWVKV

- 5           están fusionados con un péptido señal GM-CSF.
10. El agente y el ácido nucleico que codifica la proteína p55<sup>Gag</sup> para su uso en el método de la reivindicación 8 o 9, en el que:
- 10           (a) los ácidos nucleicos se administran por vía intramuscular seguido de electroporación *in vivo*; y/o  
              (b) el ácido nucleico que codifica la proteína p55<sup>Gag</sup> se administra al menos dos semanas después de la etapa (a).

Figura 1

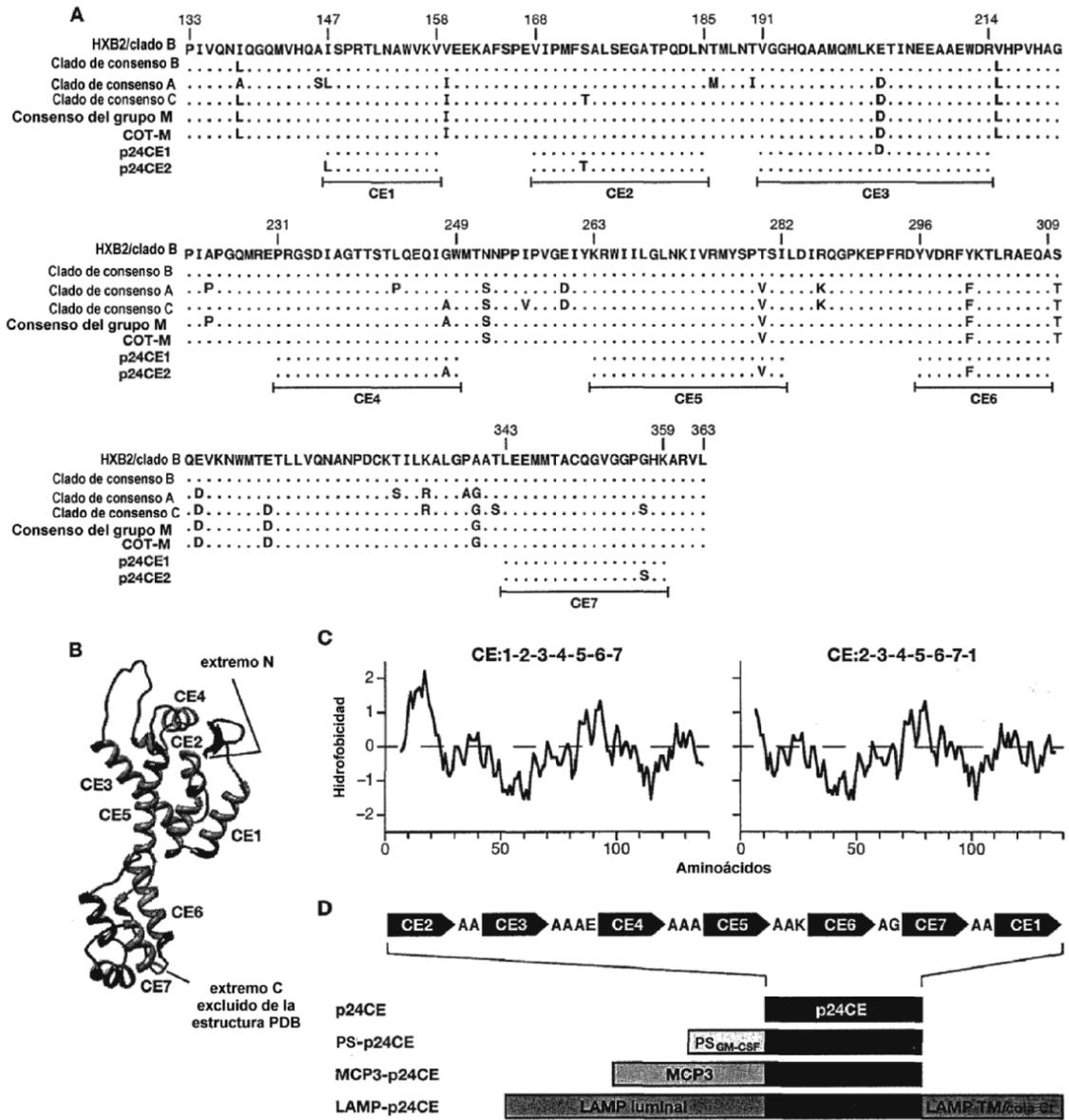


Figura 2

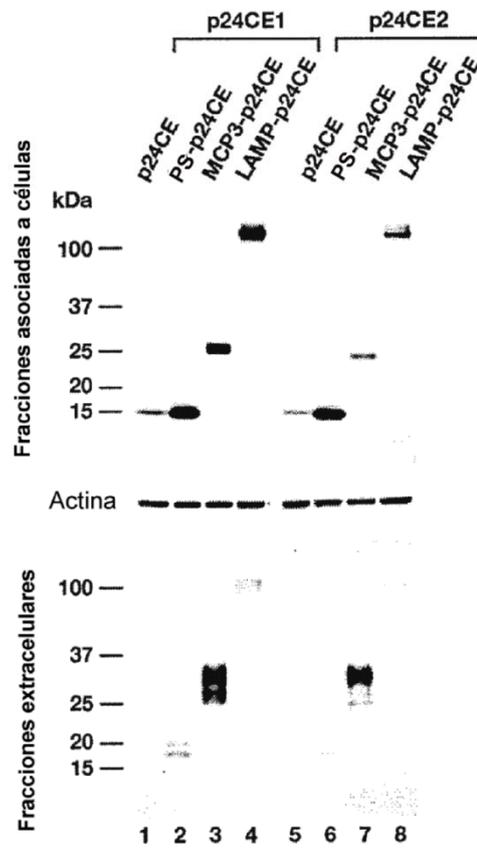


Figura 3

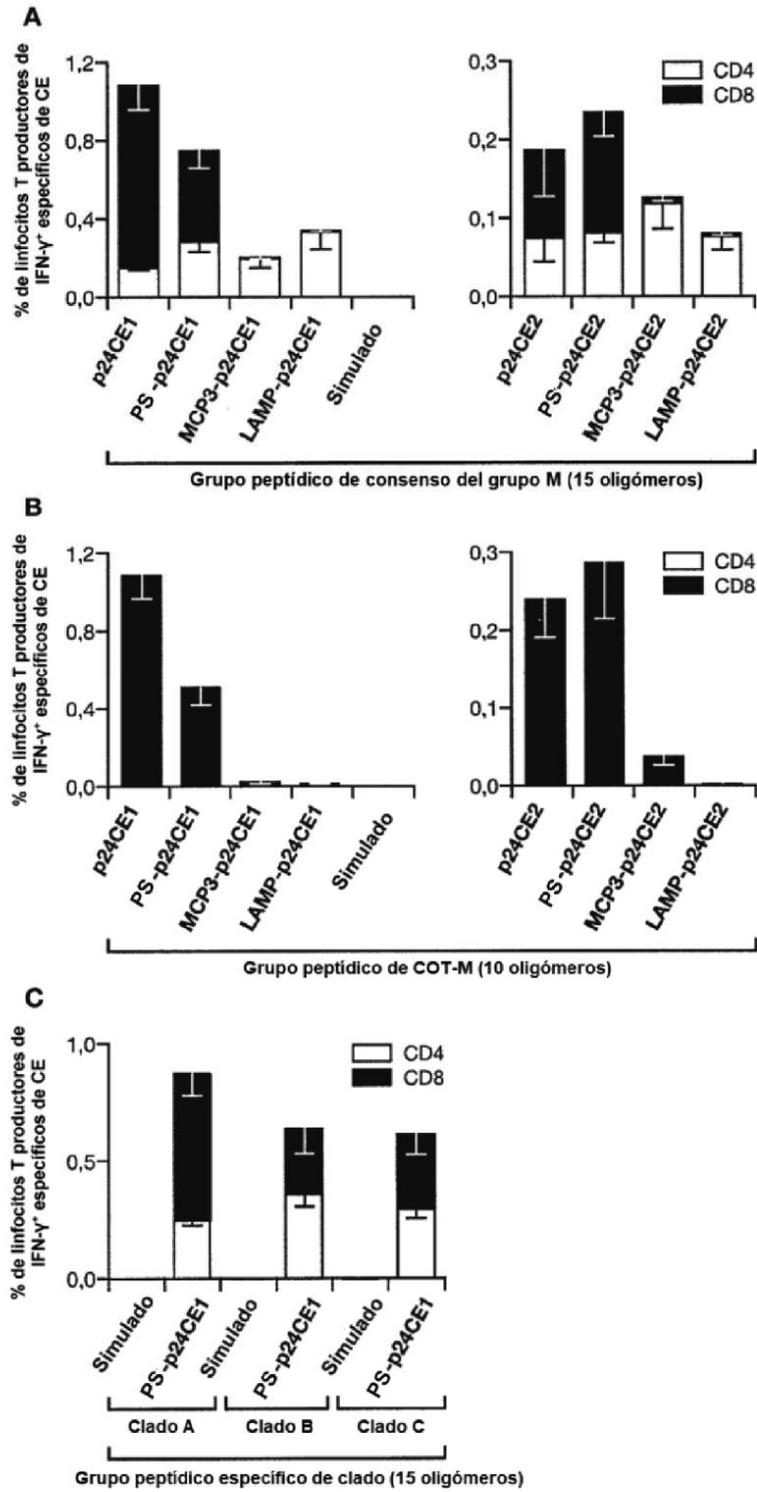
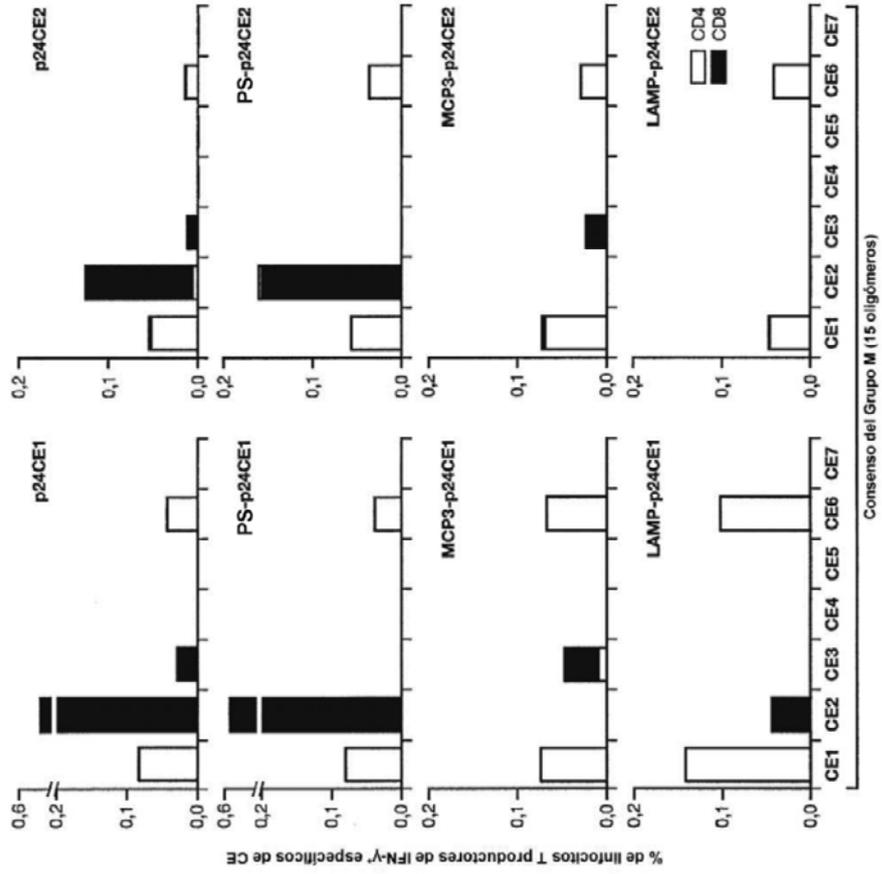


Figura 4



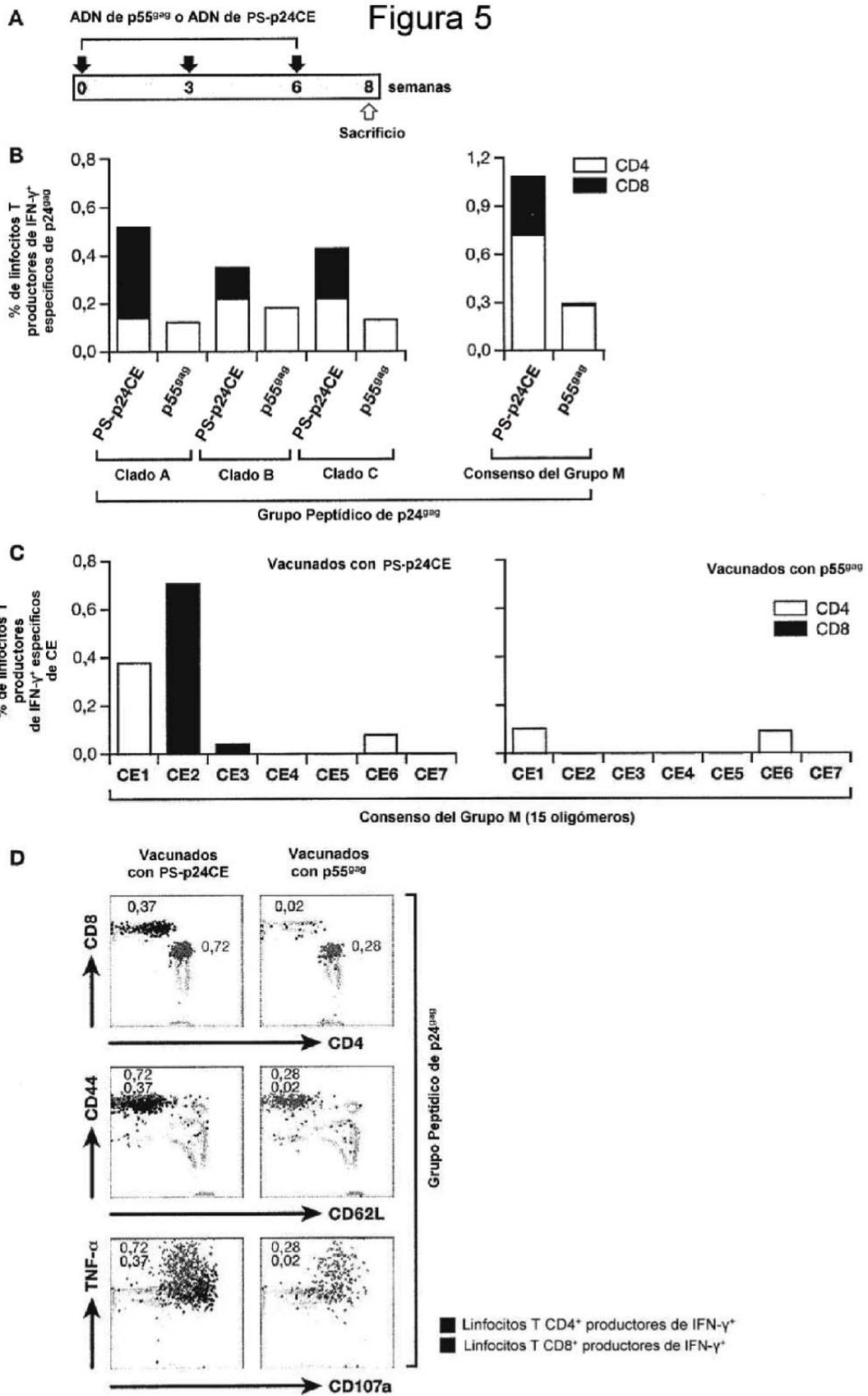


Figura 6

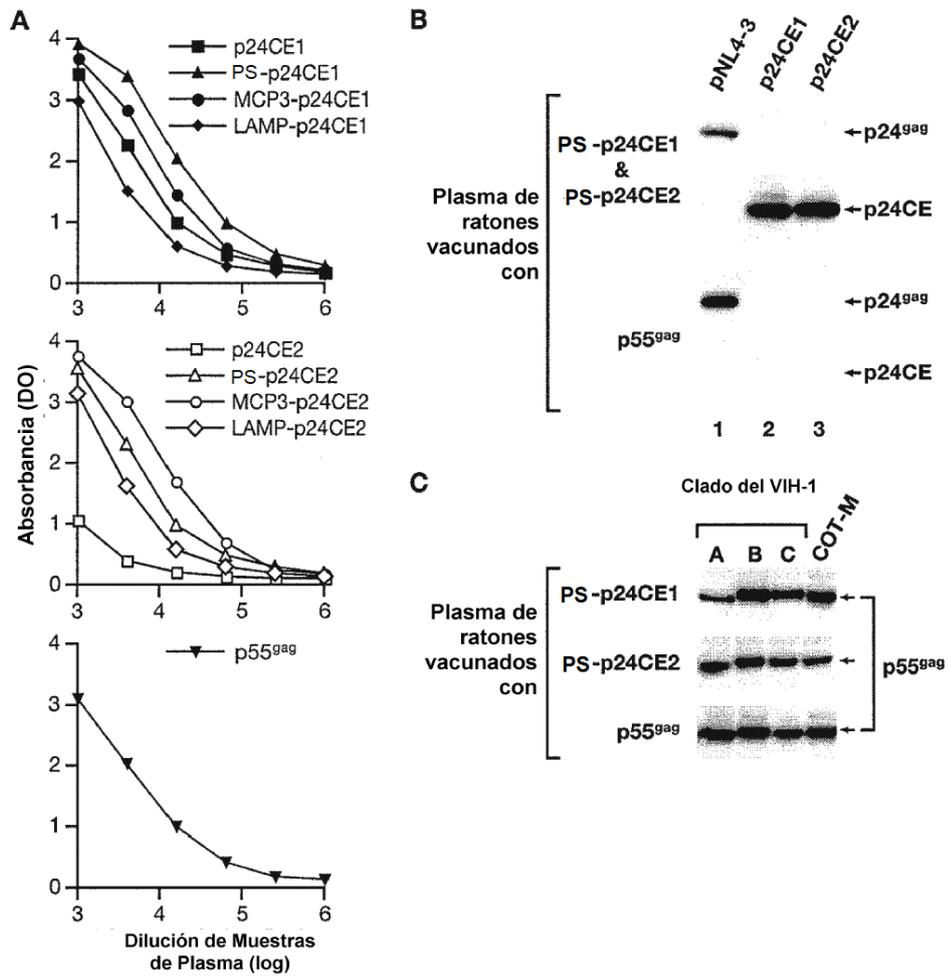


Figura 7

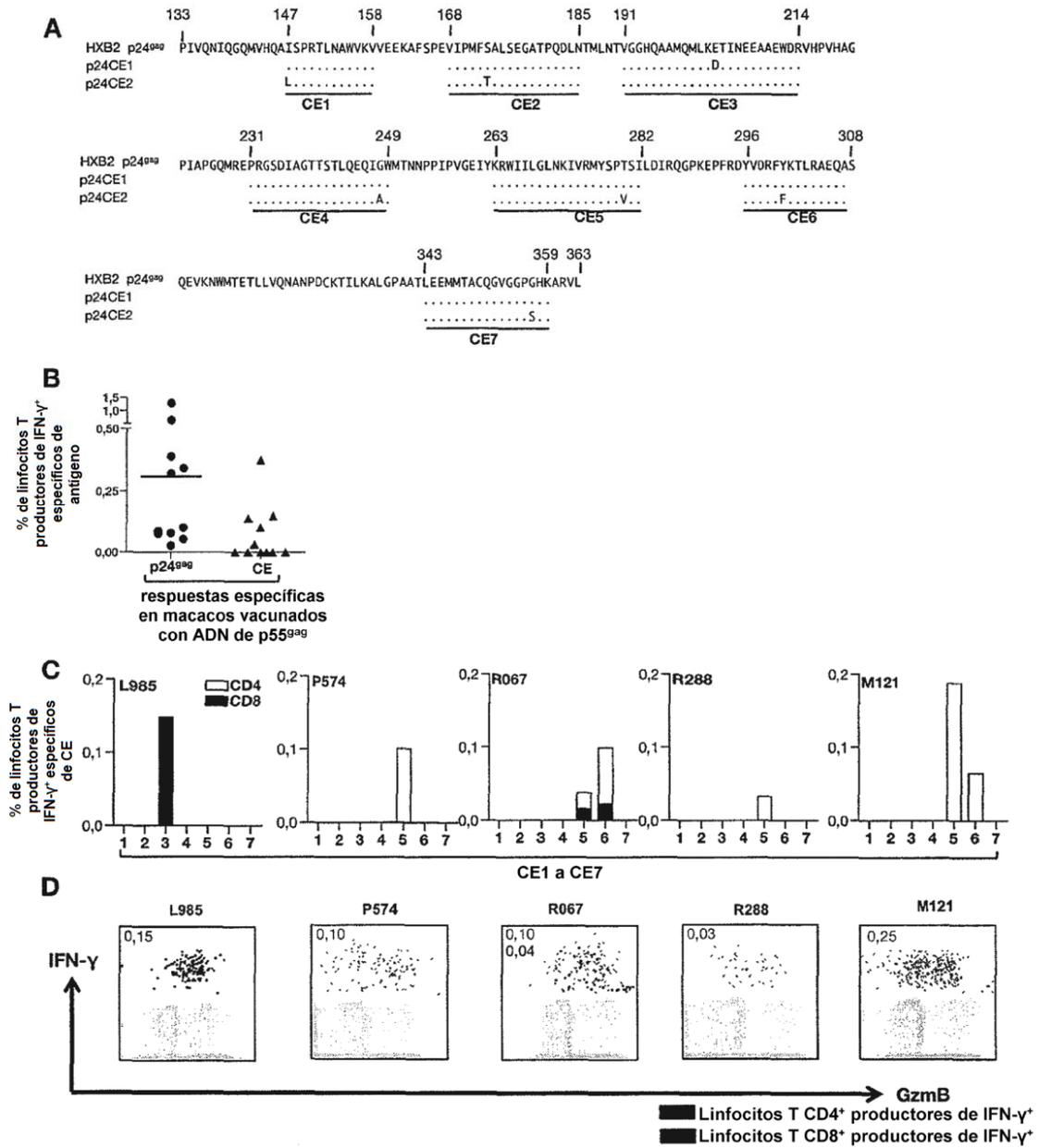


Figura 8

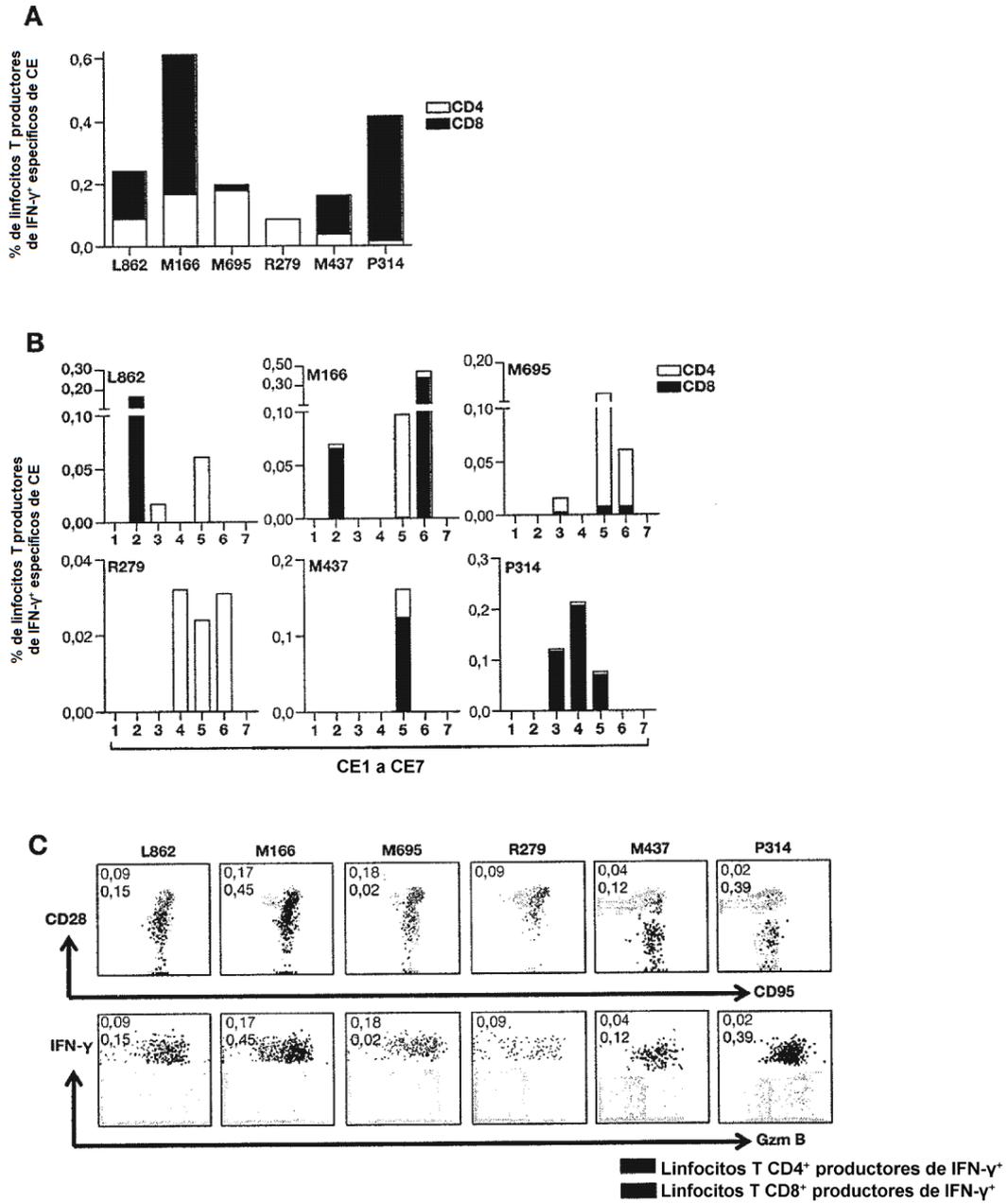


Figura 9

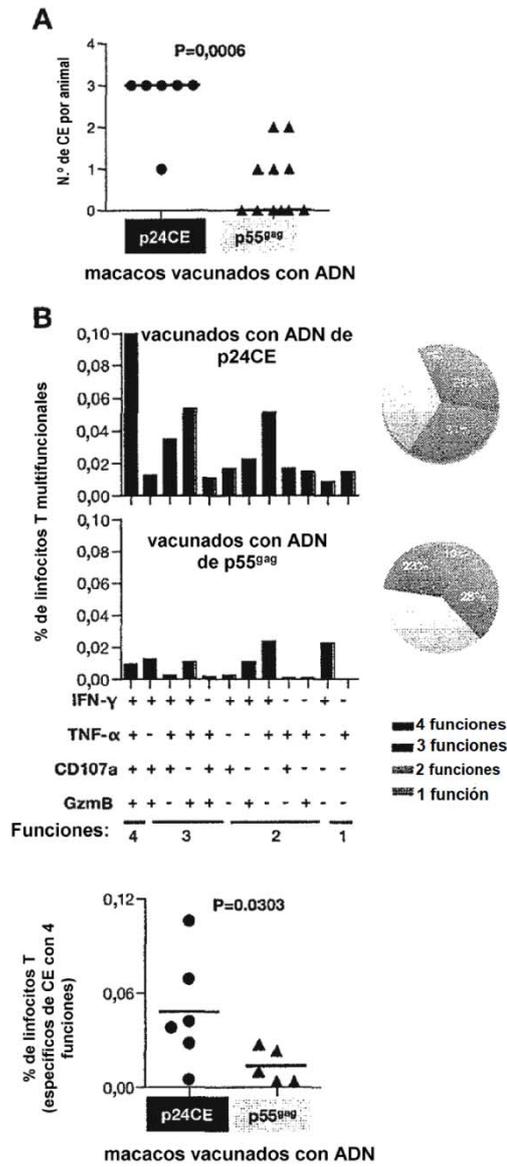


Figura 10

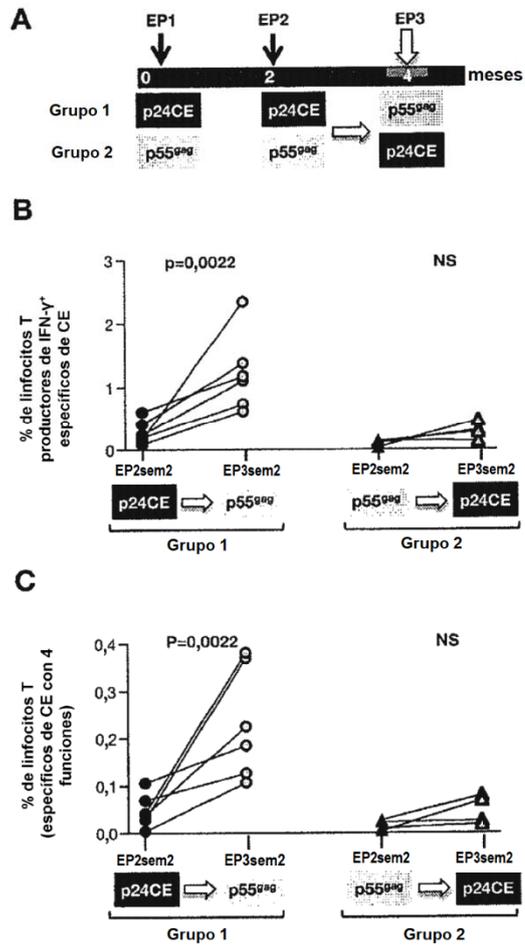


Figura 11

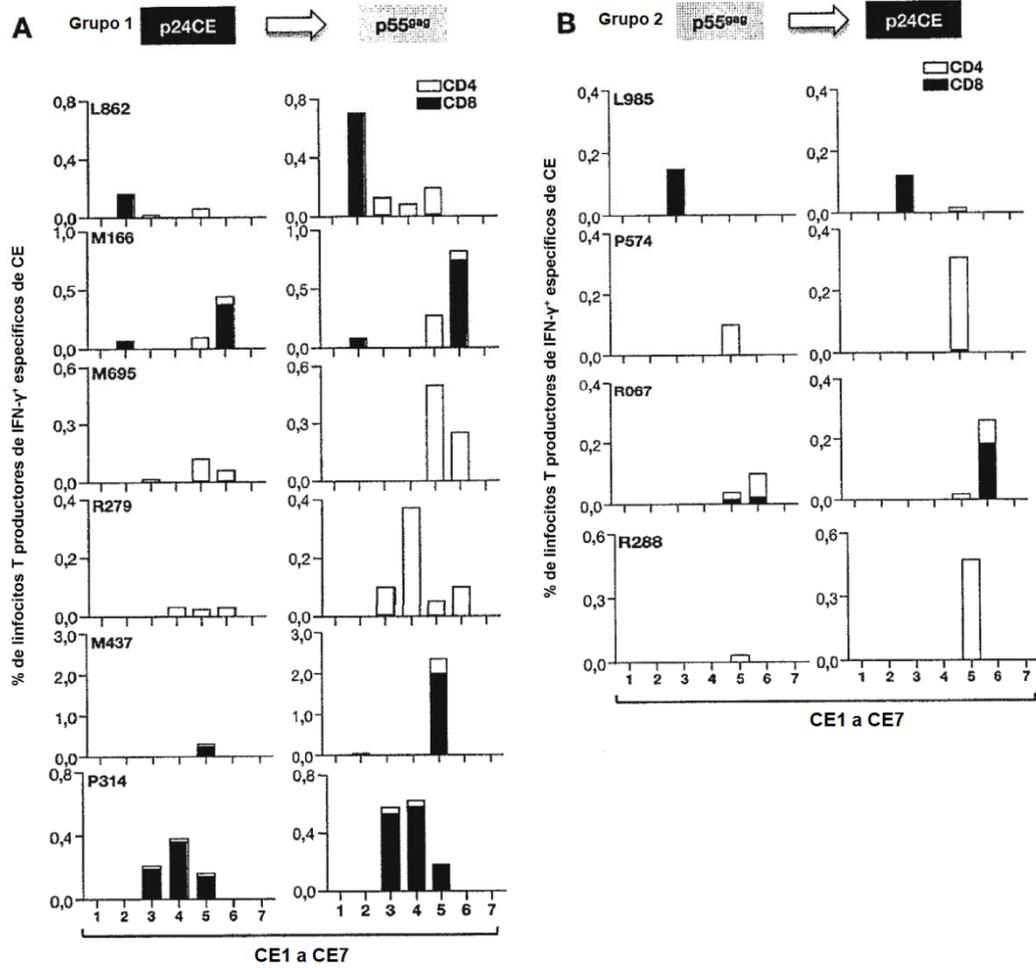
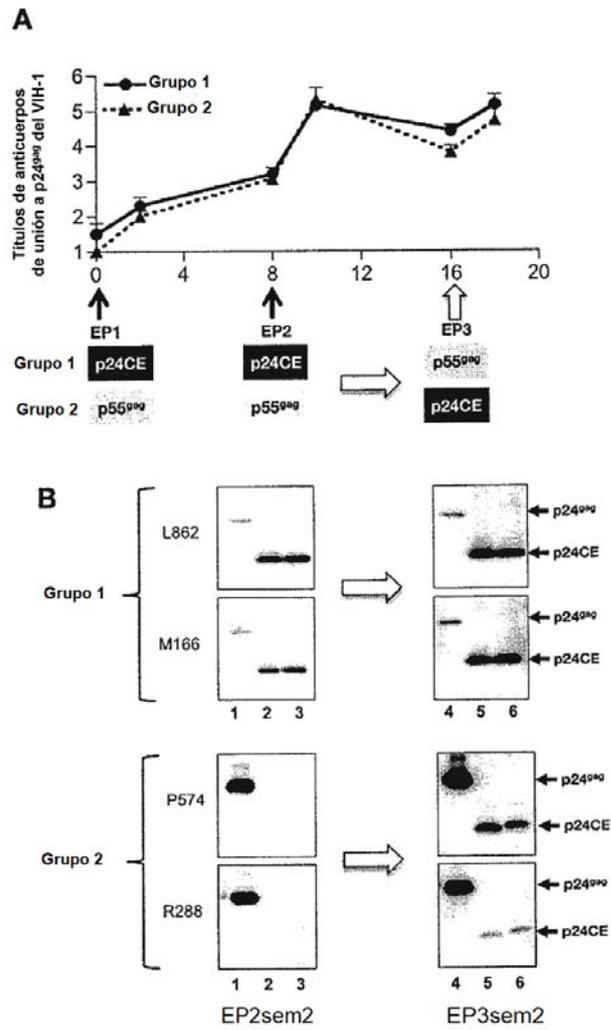


Figura 12



## Figura 13

**p24CEc**  
 configuración de p24CEc: CE8 - 9 - 3 - 4 - 5 - 6

CE8  
 P24CE1c QGMVHQAI SPRTLNAWVKV **LAK**EKAFSPEVI PMFSALSEGATPQDLN**AAK**VGGHQAAQMMLKETINEEAAEWDRAAAE  
 P24CE2c QGMVHQALS PRTLNAWVKV **LAK**EKGFNPEVI PMFTALSEGATPQDLN**AAK**VGGHQAAQMMLKDTINEEAAEWDRAAAE  
 CE4  
 p24CE1c PRGSDIAGTTSTLQEQIGW**AAA**KRWIILGLNKIVRMYSPTS**IAAK**YVDRFYKTLRAEQA  
 p24CE2c PRGSDIAGTTSTLQEQIAW**AAA**KRWIILGLNKIVRMYSPTS**IAAK**YVDRFFKTLRAEQA  
 CE5  
 CE6

p24CE1c  
 QGMVHQAI SPRTLNAWVKV **LAK**EKAFSPEVI PMFSALSEGATPQDLN**AAK**VGGHQAAQMMLKETINEEAAEWDRAAAE  
 PRGSDIAGTTSTLQEQIGW**AAA**KRWIILGLNKIVRMYSPTS**IAAK**YVDRFYKTLRAEQA

p24CE2c  
 QGMVHQALS PRTLNAWVKV **LAK**EKGFNPEVI PMFTALSEGATPQDLN**AAK**VGGHQAAQMMLKDTINEEAAEWDRAAAE  
 PRGSDIAGTTSTLQEQIAW**AAA**KRWIILGLNKIVRMYSPTS**IAAK**YVDRFFKTLRAEQA

**p24CEd**  
 configuración de p24CEd: CE9 - 3 - 4 - 5 - 6 - 8

CE9  
 p24CE1d EEKAFSPEVI PMFSALSEGATPQDLN**AAK**VGGHQAAQMMLKETINEEAAEWDRAAAE PRGSDIAGTTSTLQEQIGW**AAA**  
 P24CE2d EEKGFNPEVI PMFTALSEGATPQDLN**AAK**VGGHQAAQMMLKDTINEEAAEWDRAAAE PRGSDIAGTTSTLQEQIAW**AAA**  
 CE3  
 CE4  
 CE5  
 CE6  
 CE8

p24CE1d  
 KRWIILGLNKIVRMYSPTS**IAAK**YVDRFYKTLRAEQAAALQGMVHQAI SPRTLNAWVKV  
 p24CE2d KRWIILGLNKIVRMYSPTS**IAAK**YVDRFFKTLRAEQAAALQGMVHQAL SPRTLNAWVKV

p24CE1d  
 EEKAFSPEVI PMFSALSEGATPQDLN**AAK**VGGHQAAQMMLKETINEEAAEWDRAAAE PRGSDIAGTTSTLQEQIGW**AAA**  
 KRWIILGLNKIVRMYSPTS**IAAK**YVDRFYKTLRAEQAAALQGMVHQAI SPRTLNAWVKV

p24CE2d  
 EEKGFNPEVI PMFTALSEGATPQDLN**AAK**VGGHQAAQMMLKDTINEEAAEWDRAAAE PRGSDIAGTTSTLQEQIAW**AAA**  
 KRWIILGLNKIVRMYSPTS**IAAK**YVDRFFKTLRAEQAAALQGMVHQAL SPRTLNAWVKV

Figura 14a

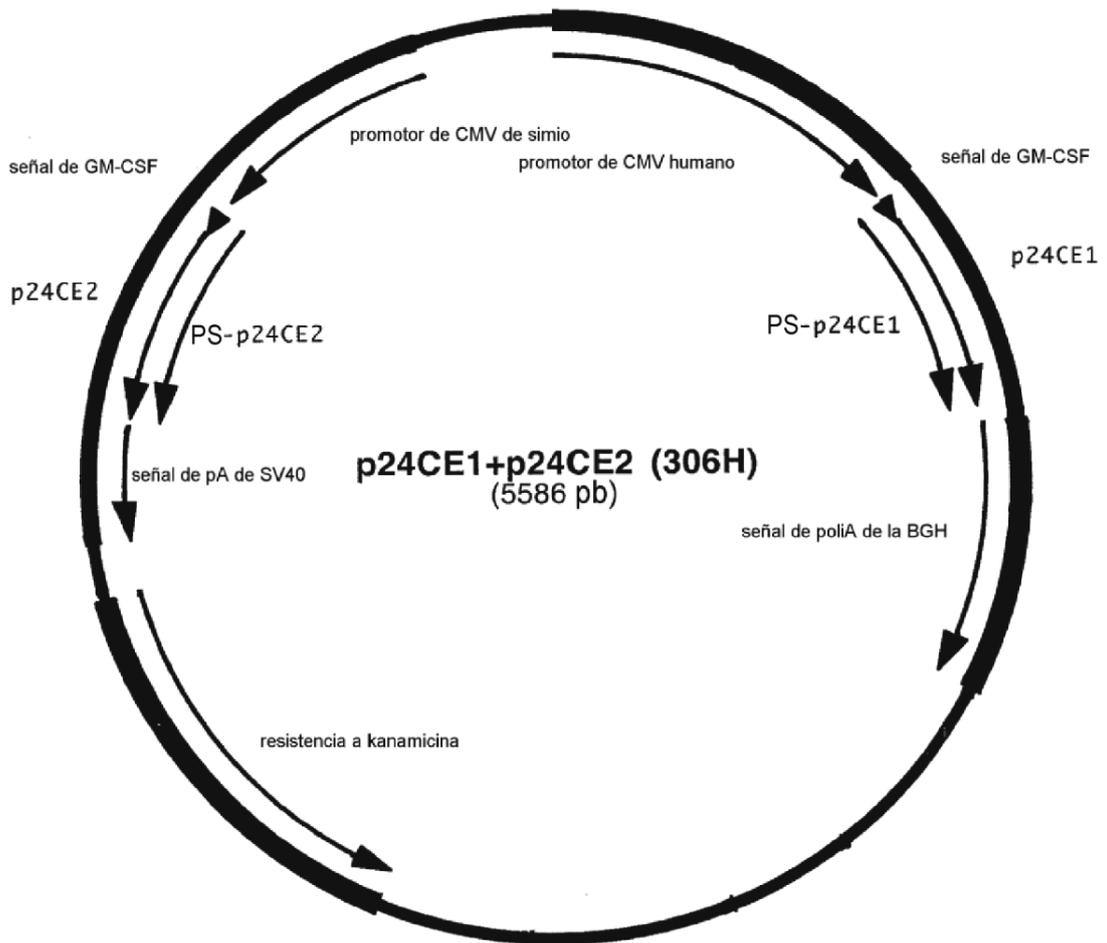




Figura 14b (con.)

4335 CAC CCA GGC GTT GAG GGT GCG AGG CGA GAG GGC CGC CTT GTG CGA CGG TCC TCC GAC TCC CTG GCA GGC TGT CAT CAT CTC  
 138<sup>4</sup> V W A N L T R P S L A A K H S P G G V G Q C A T M M E  
 155<sup>4</sup> V W A N L T R P S L A A K H S P G G V G Q C A T M M E  
 4416 CTC GAG ACC CGC GGC CTG CTC TGC CCT CAG CGT CTT GAA GAA GCG GTC TAC GTA TTT GGC CGC GAT GCT GAC TGG GCT GTA  
 111<sup>4</sup> E L G A A Q E A R L T K F F R D V Y K A A I S V P S Y  
 128<sup>4</sup> E L G A A Q E A R L T K F F R D V Y K A A I S V P S Y  
 4497 CAT CCT GAC GAT CTT GTT GAG GCC CAG GAT GAT CCA GCG CTT GGC TGC AGC CCA GGC GAT CTG CTC CTG GAG GGT GCT GGT  
 84<sup>4</sup> M R V I K N L G L I I W R K A A A W A I Q E Q L T S T  
 101<sup>4</sup> M R V I K N L G L I I W R K A A A W A I Q E Q L T S T  
 4578 CGT GCC TGC GAT GTC GCT ACC CCT TGG CTC AGC TGC TGC CCT GTC CCA CTC GGC TGC CTC CTC GTT GAT GGT CTC CTT GAG  
 57<sup>4</sup> T G A I D S G R P E A A A R D W E A A E E N I T E K L  
 74<sup>4</sup> T G A I D S G R P E A A A R D W E A A E E N I T E K L  
 4659 CAT CTG CAT TGC CGC CTG GTG TCC ACC GAC CGC GGC GTT GAG GTC CTG CGG TGT CGC ACC CTC ACT GAG TGC GGT GAA CAT  
 30<sup>4</sup> M Q M A A Q H G G V A A N L D Q P T A G E S L A T F M  
 47<sup>4</sup> M Q M A A Q H G G V A A N L D Q P T A G E S L A T F M  
 4740 GGG GAT GAC CGA GAT CGA GCA CGC CAC GGT CCC GAG TAG CAG GAG CGA CTG CAG CCA CAT *ttcttcggttaaacgtcgacagatccaa*  
 3<sup>4</sup> P I <sup>3/4</sup> S I S C A V T G L L L L S Q L W M  
 20<sup>4</sup> P I V S I S C A V T G L L L L S Q L W M  
 4829 *acgctcctccgacgtccccagggcagaatggcgggtccctaaacgagactgcttatatagacctcccattaggcacgcctaccgccatttacgctcaatggaacgcccat*  
 4939 *TTGCGTCATTGCCCTCCCCATTGACGTCAATGGGGATGTACTTGGCAGCCATCGCGGGCCATTTACCGCCATTGACGTCAATGGGAGTACTGCCAATGTACCTGGCGT*  
 5049 *ACTTCCAATAGTAATGTACTTGCCAAGTTACTATTAATAGATATTGATGACTGCCAAGTGGGCCATTTACCGTCATTGACGTCAATAGGGGGCGTGAGAACGGATGTA*  
 5159 *ATGGGCAATGAGCCATCCCATTGACGTCAATGGTGGGTGGTCTATTGACGTCAATGGGCATTGAGCCAGGCGGGCCATTTACCGTAATTGACGTCAATGGGGAGGGCGC*  
 5269 *CATATACGTCAATAGGACCGCCCATATGACGTCAATAGGTAAGACCATGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCTTTCGGTGATGACGGTGA AAAACCTCTGACACATGACAGCTCC*  
 5379 *CGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCTCAGCGGGTGTGGCGGGTCTGGGGCTGGCTTAATCTATGCGGCATCA*  
 5489 *GAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGATTGGCTATTGGCATTATGCC*

Figura 15a

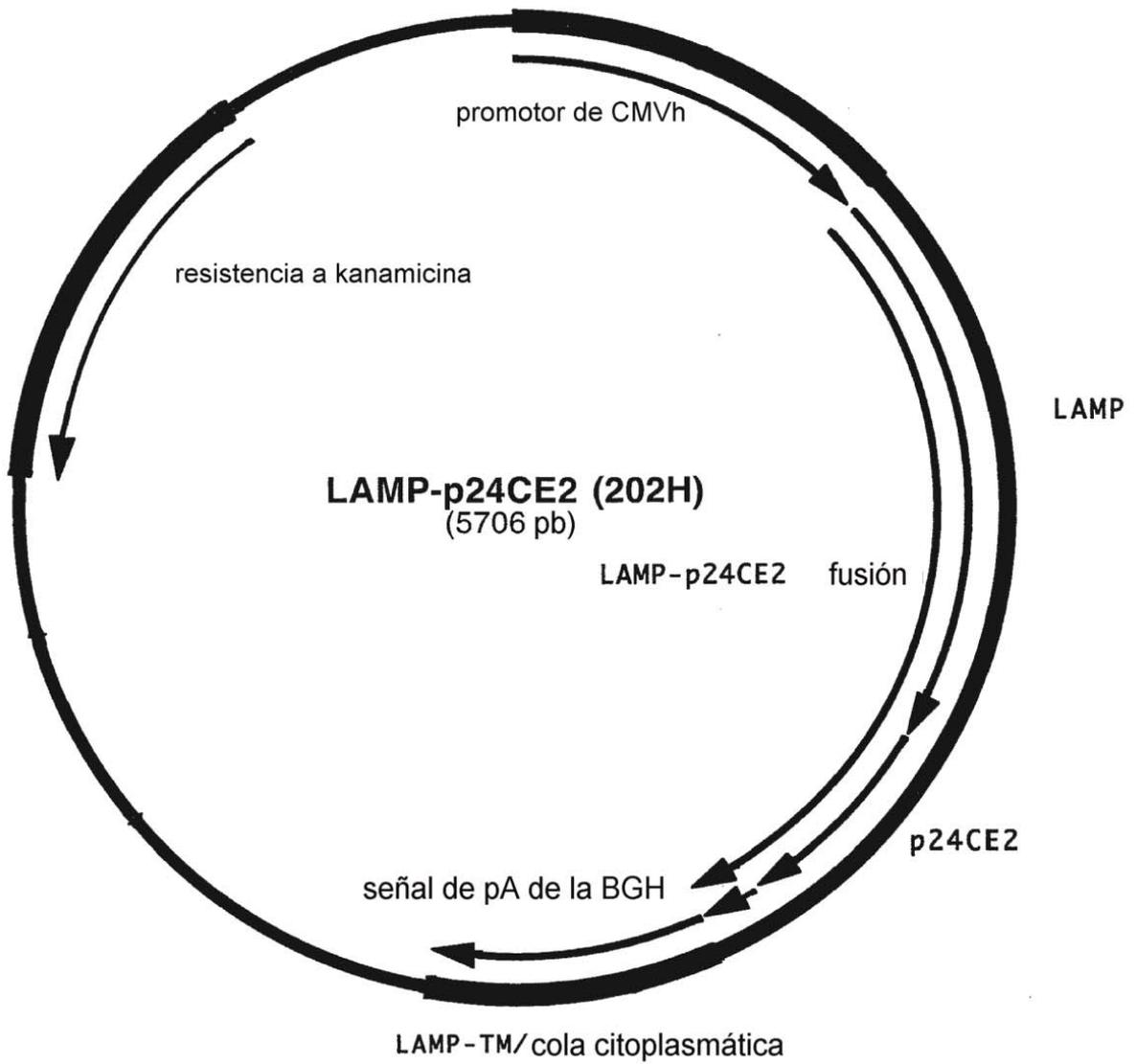


Figura 15b

1 CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTATTAAATAGTAA  
111 TCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGCTC  
221 AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATA  
331 TGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGGCCCGCTGGCATATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTA  
441 GTCATCGTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCTTACGCTCAATGGGAG  
551 TTTGTTTTGGCACC AAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAATGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGCTATATAAGCAGAG  
661 CTCGTTTATGAAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGggggcgcgctgactagc  
768 ATG GCG CCC CGC AGC GCC CGG CGA CCC CTG CTG CTG CTA CTG CTG TTG CTG CTG CTC GGC CTC ATG CAT TGT GCG TCA GCA  
1 M A P R S A R R P L L L L L L L L L L L G L M H C A S A  
1 M A P R S A R R P L L L L L L L L L L L G L M H C A S A  
849 GCA ATG TTT ATG GTG AAA AAT GGC AAC GGG ACC GCG TGC ATA ATG GCC AAC TTC TCT GCT GCC TTC TCA GTG AAC TAC GAC  
28 M F M V K N G N G T A C I M A N F S A A F S V N Y D  
28 M F M V K N G N G T A C I M A N F S A A F S V N Y D  
930 ACC AAG AGT GGC CCT AAG AAC ATG ACC CTT GAC CTG CCA TCA GAT GCC ACA GTG GTG CTC AAC CGC AGC TCC TGT GGA AAA  
55 T K S G P K N M T L D L P S D A T V V L N R S S C G K  
55 T K S G P K N M T L D L P S D A T V V L N R S S C G K  
1011 GAG AAC ACT TCT GAC CCC AGT CTC GTG ATT GCT TTT GGA AGA GGA CAT ACA CTC ACT CTC AAT TTC ACG AGA AAT GCA ACA  
82 E N T S D P S L V I A F G R G H T L T L N F T R N A T  
82 E N T S D P S L V I A F G R G H T L T L N F T R N A T  
1092 CGT TAC AGC GTT CAG CTC ATG AGT TTT GTT TAT AAC TTG TCA GAC ACA CAC CTT TTC CCC AAT GCG AGC TCC AAA GAA ATC  
109 R Y S V Q L M S F V Y N L S D T H L F P N A S S K E I  
109 R Y S V Q L M S F V Y N L S D T H L F P N A S S K E I  
1173 AAG ACT GTG GAA TCT ATA ACT GAC ATC AGG GCA GAT ATA GAT AAA AAA TAC AGA TGT GTT AGT GGC ACC CAG GTC CAC ATG  
136 K T V E S I T D I R A D I D K K Y R C V S G T Q V H M  
136 K T V E S I T D I R A D I D K K Y R C V S G T Q V H M  
1254 AAC AAC GTG ACC GTA ACG CTC CAT GAT GCC ACC ATC CAG GCG TAC CTT TCC AAC AGC AGC TTC AGC AGG GGA GAG ACA CGC  
163 N N V T V T L H D A T I Q A Y L S N S S F S R G E T R  
163 N N V T V T L H D A T I Q A Y L S N S S F S R G E T R  
1335 TGT GAA CAA GAC AGG CCT TCC CCA ACC ACA GCG CCC CCT GCG CCA CCC AGC CCC TCG CCC TCA CCC GTG CCC AAG AGC CCC  
190 C E Q D R P S P T T A P P A P P S P S P S P S P V P K S P  
190 C E Q D R P S P T T A P P A P P S P S P S P S P V P K S P  
1416 TCT GTG GAC AAG TAC AAC GTG AGC GGC ACC AAC GGG ACC TGC CTG GCG AGC ATG GGG CTG CAG CTG AAC CTC ACC TAT  
217 S V D K Y N V S G T N G T C L L A S M G L Q L N L T Y  
217 S V D K Y N V S G T N G T C L L A S M G L Q L N L T Y  
1497 GAG AGG AAG GAC AAC ACG ACG GTG ACA AGG CTT CTC AAC ATC AAC CCC AAC AAG ACC TCG GCC AGC GGG AGC TGC GGC GCC  
244 E R K D N T T V T R L L N I N P N K T S A S G S C G A  
244 E R K D N T T V T R L L N I N P N K T S A S G S C G A  
1578 CAC CTG GTG ACT CTG GAG CTG CAC AGC GAG GGC ACC ACC GTC CTG CTC TTC CAG TTC GGG ATG AAT GCA AGT TCT AGC CGG  
271 H L V T L E L H S E G T T V L L F Q F G M N A S S R  
271 H L V T L E L H S E G T T V L L F Q F G M N A S S R  
1659 TTT TTC CTA CAA GGA ATC CAG TTG AAT ACA ATT CTT CPT GAC GCC AGA GAC CCT GCC TTT AAA GCT GCC AAC GGC TCC CTG  
298 F F L Q G I Q L N T I L P D A R D P A F K A A N G S L  
298 F F L Q G I Q L N T I L P D A R D P A F K A A N G S L  
1740 CGA GCG CTG CAG GCC ACA GTC GGC AAT TCC TAC AAG TGC AAC GCG GAG CAC GTC CGT GTC ACG AAG GCG TTT TCA GTC  
325 R A L Q A T V G N S Y K C N A E E H V R V T K A F S V  
325 R A L Q A T V G N S Y K C N A E E H V R V T K A F S V  
1821 AAT ATA TTC AAA GTG TGG GTC CAG GCT TTC AAG GTC GAA GGT GGC CAG TTT GGC TCT GTG GAG GAG TGT CTG GTC GAC GAG  
352 N I F K V W V Q A F K V E G G Q F G S V E E C L L D E  
352 N I F K V W V Q A F K V E G G Q F G S V E E C L L D E  
1902 AAC AGC CTC GAG GAT ATC GTC ATC CCG ATG TTC ACG GCG CTC AGC GAG GGA GCG ACG CCG CAG GAC CTG AAC GCG GCC GTC  
379 N S L E D I V I P M F T A L S E G A T P Q D L N A A V  
379 N S L E D I V I P M F T A L S E G A T P Q D L N A A V  
1983 GGA GGT CAC CAG GCA GCG ATG CAG ATG CTG AAG GAG ACG ATC AAC GAG GAG GCG GCC GAG TGG GAC CGG GCG GCA GCC GAG  
22 G G H Q A A M Q M L K E T I N E E A A E W D R A A A E  
406 G G H Q A A M Q M L K E T I N E E A A E W D R A A A E  
2064 CCA CGC GGT TCC GAC ATC GCG GGC ACC ACC TCG ACG CTC CAG GAG CAG ATC GCG TGG GCC GCA GCT AAG CGC TGG ATC ATC  
49 P R G S D I A G T T S T L Q E Q I A W A A A K R W I I  
433 P R G S D I A G T T S T L Q E Q I A W A A A K R W I I  
2145 CTC GGG CTG AAC AAG ATC GTC CGG ATG TAC AGC CCG GTC TCG ATC GCT GCT AAG TAC GTT GAC CGG TTC TTC AAG ACC CTG  
76 L G L N K I V R M Y S P V S I A A K Y V D R F F K T L  
460 L G L N K I V R M Y S P V S I A A K Y V D R F F K T L  
2226 AGG GCC GAG CAG GCG GCC GGA CTG GAG GAG ATG ATG ACC GCG TGC CAG GGG GTC GGT GGA CCA TCG CAC AAG GCC GCG CTC  
103 R A E Q A A G L E E M M T A C Q G V G G P S H K A A L  
487 R A E Q A A G L E E M M T A C Q G V G G P S H K A A L  
2307 TCG CCG CGC ACG CTG AAC GCG TGG GTG AAG GTC GGA TCC GAA TTC ACG CTG ATC CCC ATC GCT GTG GGT GGT GCC CTG GCG  
130 S P R T L N A W V K V 1 T L I P I A V G G A L A  
514 S P R T L N A W V K V G S E F T L I P I A V G G A L A  
2388 GGG CTG GTC CTC ATC GTC CTC ATC GCC TAC CTC GTC GCG AGG AAG AGG AGT CAC GCA GGC TAC CAG ACT ATC TAG ggtacctcta  
13 G L V L I V L I A Y L V G R K R S H A G Y Q T I •  
541 G L V L I V L I A Y L V G R K R S H A G Y Q T I •  
2473 gGATCTGCTGTGCCCTTAGTGGCAGCCATCTGTGTTGCCCTCCCGCTGCTTCTTACCCCTGGAAAGTGGCCACTCCACTGCTCTTCTTAATAAAATGAGGA  
2583 AATTGCATCGCATGTTCTGAGTAGGTGTCATTCTATCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGG  
2693 TGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTCTCTCTGGGCGAGAAAGAGCAGGCACATCCCTTCTCTGTGACACACCTGTCCACGCCCTGGTTC

Figura 15b (con.)

2803 TTAGTTCACGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGCTCCGCCCTCAATCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATAGCCACCAAA

2913 CCAAACCTAGCTCCAAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTGACAGAGGAGAGAAATGCCTCCAACATGTAGGAAAGTAATGAGAGAAATCATAGA

3023 ATTTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAGCGGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGA

3133 TAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCACA

3243 AAAATCGAGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGGCGTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCTCGCCGCTT

3353 ACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGGTAGGTCTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGT

3463 GCACGAACCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCTTATCCGTAACACTGCTTGTAGTCCAAACCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCACTGGTAACA

3573 GGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGTGAAGCCA

3683 GTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTTGTATCCGGCAAAACAAACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACCGCGAGAAAAAAGGATC

3793 TCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACTAGATCC

3903 TTTTAAATAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACAAATGCTTAATCAGTGAGGACACATCTCAGCGATCTGCTA

4013 TTTCTTTCATCATAGTTGCTGACTCGGGGGGGGGGGCGCTGAGGTCTGCTCGTGAAGAAGGTGTTGCTGACTCATACCCAGGCTGAATCGCCCATCATCCAGCC

4123 AGAAAGTGAGGGAGCCACGGTTGATGAGAGCTTTGTTGAGGTGACCAAGTGGTGAATTTTGAACTTTTGCTTTCACGGAAACGGTCTGCGTTTGGGGAAGATGCGTG

4233 ATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAAGTTCGATTTATTCAACAAAAGCCGCTCCCGTCAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTACAACCAATTAACCAATCTGATTA

4342 GAA AAA CTC ATC GAG CAT CAA ATG AAA CTG CAA TTT ATT CAT ATC AGG ATT ATC AAT ACC ATA TTT TTG AAA AAG CCG TTT

2714 F F E D L M L H F Q L K N M D P N D I G Y K Q F L R K

4423 CTG TAA TGA AGG AGA AAA CTC ACC GAG GCA GTT CCA TAG GAT GGC AAG ATC CTG GTA TCG GTC TGC GAT TCC GAC TCG TCC

2444 Q L S P S F E G L C N W L I A L D Q Y R D A I G V R G

4504 AAC ATC AAT ACA ACC TAT TAA TTT CCC CTC GTC AAA AAT AAG GTT ATC AAG TGA GAA ATC ACC ATG AGT GAC GAC TGA ATC

2174 V D I C G I L K G E D F I L N D L S F D G H T V V S D

4585 CGG TGA GAA TGG CAA AAG CTT ATG CAT TTC TTT CCA GAC TTG TTC AAC AGG CCA GCC ATT ACG CTC GTC ATC AAA ATC ACT

1904 P S F P L L K H M E K W V Q E V P W G N R E D D F D S

4666 CGC ATC AAC CAA ACC GTT ATT CAT TCG TGA TTG CGC CTG AGC GAG ACG AAA TAC GCG ATC GCT GTT AAA AGG ACA ATT ACA

1634 A D V L G N N M R S Q A Q A L R F V R D S N F P C N C

4747 AAC AGG AAT CGA ATG CAA CCG GCG CAG GAA CAC TGC CAG CGC ATC AAC AAT ATT TTC ACC TGA ATC AGG ATA TTC TTC TAA

1364 V P I S H L R R L F V A L A D V I N E G S D P Y E E L

4828 TAC CTG GAA TGC TGT TTT CCC GGG GAT CGC AGT GGT GAG TAA CCA TGC ATC ATC AGG AGT ACG GAT AAA ATG CTT GAT GGT

1094 V Q F A T K G P I A T T L L W A D D P T R I F H K I T

4909 CGG AAG AGG CAT AAA TTC CGT CAG CCA GTT TAG TCT GAC CAT CTC ATC TGT AAC ATC ATT GGC AAC GCT ACC TTT GCC ATG

824 P L P M F E T L W N L R V M E D T V D N A V S G K G H

4990 TTT CAG AAA CAA CTC TGG CGC ATC GGG CTT CCC ATA CAA TCG ATA GAT TGT CGC ACC TGA TTG CCC GAC ATT ATC GCG AGC

554 K L F L E P A D P K G Y L R Y I T A G S Q G V N D R A

5071 CCA TTT ATA CCC ATA TAA ATC AGC ATC CAT GTT GGA ATT TAA TCG CGG CCT GGA GCA AGA CGT TTC CCG TTG AAT ATG GCT

284 W K Y G Y L D A D M N S N L R P R S C S T E R Q I H S

5152 CAT AACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGG

14 M

5261 CTTTCCCCCCCCCATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACAT

5371 TCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCTAAGAAACCAATTAATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGCGTATCACGAGGCCCTTTCGCTCGCGGCTTTCGGTGATGACG

5481 GTGAAAACCTCTGACACATGACGCTCCCGGAGCGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGAGCAGACAAGCCGTCAGGCGCGTCAAGGGGTTGGCGGGTGT

5591 CGGGCTGGCTTAACTATCGGGATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTTGTAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGATTGGC

5701 TATTGG

Figura 16 a

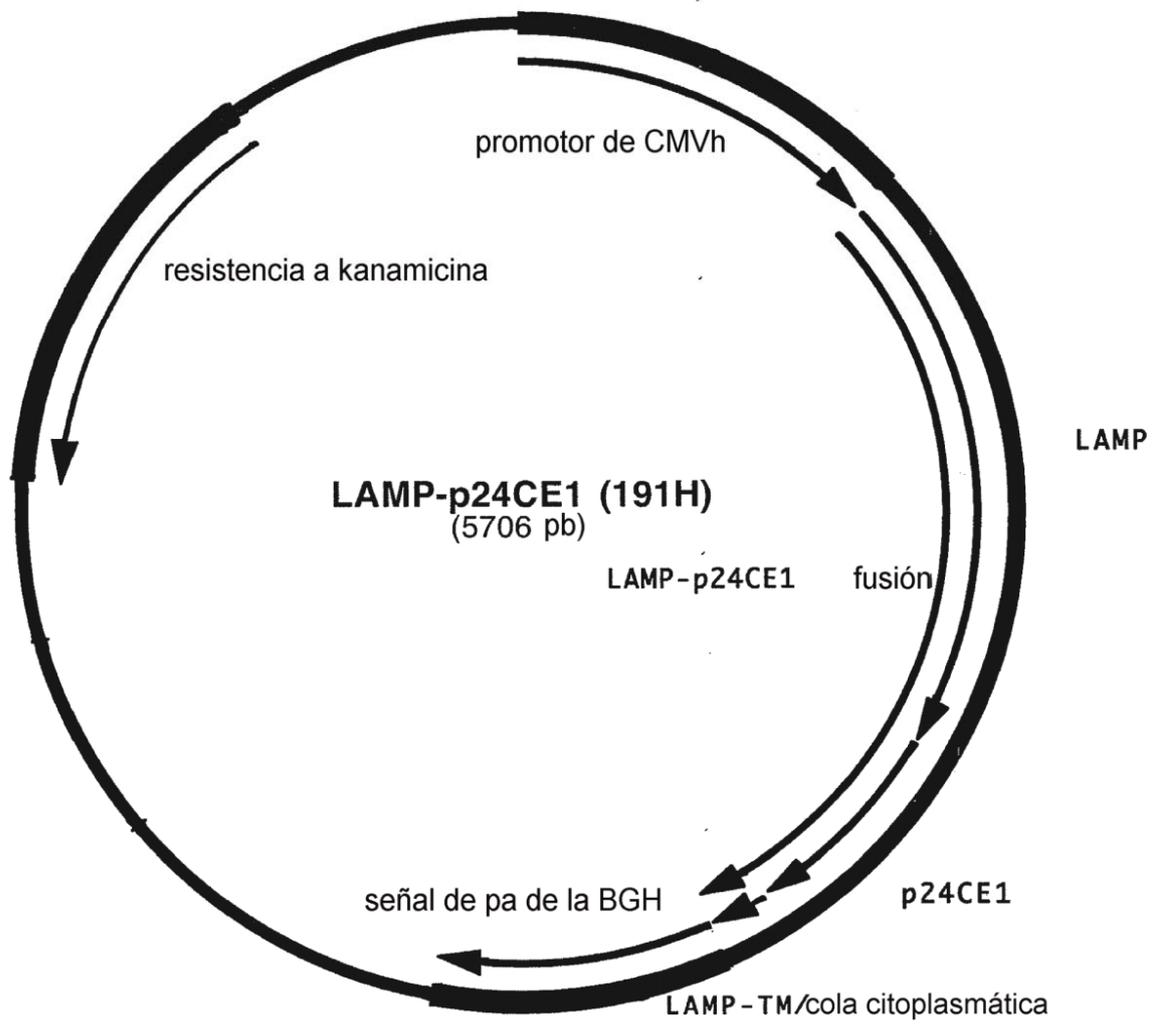






Figura 17a

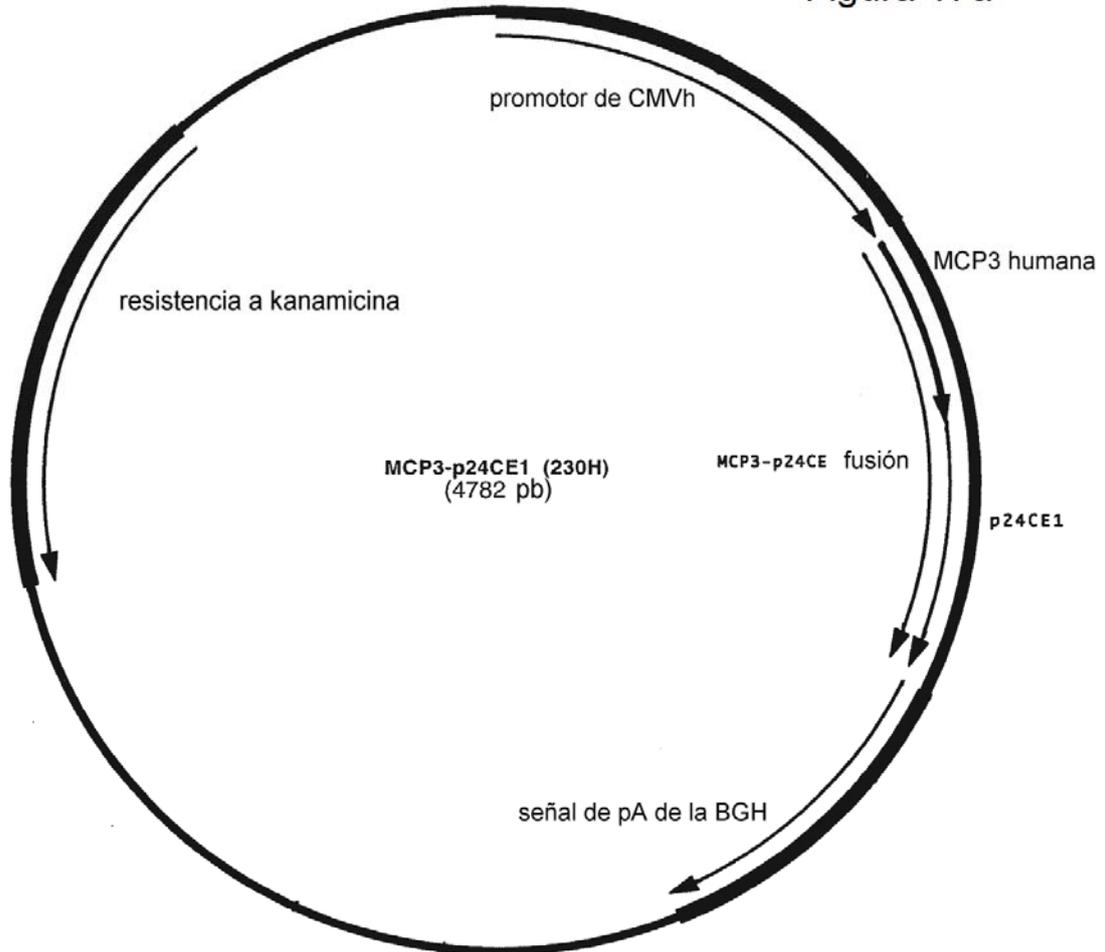


Figura 17b

1 CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAA  
111 TCAATTACGGGGTCATTAGTTATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACCTC  
221 AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATA  
331 TGCCAAGTACGCCCTTATTGACGTCAATGATGTAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTA  
441 GTCATCGCTATTACCATGGTGTGCGGTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAG  
551 TTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCATTGACGCAAATGGCGGTAGGCGGTACGTTGGGAGGTTCTATATAAGCAGAG  
661 CTCGTTTGTAGTAAACCGTCAGATCGCTGGAGAGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGcgcgcgctgacaagaa  
769 ATG TGG AAG CCG ATG CCC TCG CCA AGC AAC ATG AAG GCG TCC GCC GCG CTC CTG TGC CTG CTC CTC ACG GCC GCG GCT TTC  
1 M W K P M P S P S N M K A S A A L L C L L L T A A A F  
1 M W K P M P S P S N M K A S A A L L C L L L T A A A F  
850 AGC CCC CAG GGG CTC GCG CAG CCG GTC GGG ATC AAC ACG AGC ACG ACC TGC TGC TAC CGG TTC ATC AAC AAG AAG ATC CCG  
28 S P Q G L A Q P V G I N T S T T C C Y R F I N K K I P  
28 S P Q G L A Q P V G I N T S T T C C Y R F I N K K I P  
931 AAG CAG CGT CTG GAG AGC TAC CGC CGG ACC ACG TCG AGC CAC TGC CCG CGG GAG GCG GTC ATC TTC AAG ACG AAG CTG GAC  
55 K Q R L E S Y R R T T S S H C P R E A V I F K T K L D  
55 K Q R L E S Y R R T T S S H C P R E A V I F K T K L D  
1012 AAG GAG ATC TGC GCC CCG AAG TGG GTT CAG GAC TFC ATG AAG CAC CTG GAC AAG AAG ACG CAG ACG CCG AAG  
82 K E I C A D P T Q K W V Q D F M K H L D K K T Q T P K  
82 K E I C A D P T Q K W V Q D F M K H L D K K T Q T P K  
1093 CTG GTC ATC CCG ATG TTC TCG GCG CTC AGC GAG GGA GCG ACG CCG CAG GAC CTG AAC GCG GCC GTC GGA GGT CAC CAG GCA  
109 L  
109 L V I P M F S A L S E G A T P Q D L N A A V G G H Q A  
109 L V I P M F S A L S E G A T P Q D L N A A V G G H Q A  
1174 GCG ATG CAG ATG CTG AAG GAC ACG ATC AAC GAG GAG GCG GCC GAG TGG GAC CGG GCG GCA GCC GAG CCA CGG GGT TCC GAC  
27 A M Q M L K D T I N E E A A E W D R A A A E P R G S D  
136 A M Q M L K D T I N E E A A E W D R A A A E P R G S D  
1255 ATC GCG GGC ACC ACC TCG ACG CTC CAG GAG CAG ATC GGG TGG GCC GCA GCT AAG CCG TGG ATC ATC CTC GGG CTG AAC AAG  
54 I A G T T S T L Q E Q I G W A A A K R W I I L G L N K  
163 I A G T T S T L Q E Q I G W A A A K R W I I L G L N K  
1336 ATC GTC CGG ATG TAC AGC CCG ACG TCG ATC GCT GCT AAG TAC GTT GAC CGG TTC TAC AAG ACC CTG AGG GCC GAG CAG GCG  
81 I V R M Y S P T S I A A K Y V D R F Y K T L R A E Q A  
190 I V R M Y S P T S I A A K Y V D R F Y K T L R A E Q A  
1417 GCC GGA CTG GAG GAG ATG ATG ACC GCG TGC CAG GGG GTC GGT GGA CCA GGG CAC AAG GCC GCG ATC TCG CCG CCG ACG CTG  
108 A G L E E M M T A C Q G V G G P G H K A A I S P R T L  
217 A G L E E M M T A C Q G V G G P G H K A A I S P R T L  
1498 AAC GCG TGG GTG AAG GTC TGA TAA gaattcgcggatatacggttaacggatccaGATCTGCTGTCCCTTCTAGTTGCCAGCATCTGTGTTTGGCCCTCCCC  
135 N A W V K V . .  
244 N A W V K V . .  
1600 CGTGCCCTTCCCTGACCCCTGGAGGTTGCCACTCCCACTGCTCCTTCTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGG  
1710 TGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTCTCTCTGG  
1820 GCCAGAAAGAACGAGGCACATCCCTTCTCTGTGACACACCTGTCCACGCCCTGGTCTTAGTTCCAGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCC  
1930 TTCAATCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCTCATAGCCCAACCAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATT  
2040 AAGTGCAGAGGGAGAGAAATGCTCCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAATCATAGAATTTCTCCGCTTCTCTGCTCACTGACTCGTGCCTCGGTCTGCTGGCT  
2150 GCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACCGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGCCAGCAAAAGCCAGGAACC  
2260 GTAAAAAGGCCGCTGTGCTGGCTTTTTTCATAGGCTCCGCCCTTACGAGCATCAAAAATCGACGCTCAAGTCAAGGTTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGA  
2370 TACCAGGCGTTTCCCTCGGAAGCTCCCTGTCGCGCTCTCTGTTCCGACCTCGCCGTACCCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTGGGAAGCGTGGCGTTTCTCA  
2480 TAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGCTGTGTCACGAACCCCGTTAGCCCGACCCGCTCGCCTTATCCGGTAACTATC  
2590 GTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTCTACAGAGTTCTTGAAGTGG  
2700 TGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACGATTTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAGAGTTGGTAGCTTCTGATCCGCAAAACCAAC  
2810 CGCTGGTAGCGGTGTTTTTTTTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTACGCGGGTCTGACGCTCAGTGGAAAC  
2920 AAAACTCAGGTTAAGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTAAATTAATAAAGGATTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAA  
3030 ACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCTGTTACATAGTTGCTGACTCGGGGGGGGGGGCGGTGAGGCT  
3140 GCCTCGTGAAGAGGTGTTGCTGACTCATACAGGCTGAATCGCCCATCATCAGCCAGAAAGTGAAGGAGCCAGGTTGATGAGAGCTTTGTTGATGAGTGGACAGT  
3250 TGGTGATTTTGAACCTTTGCTTTGCCACGGAACGGTCTGCTGGGAAGATGCGTGATCTGATCCTTCAACTCAGCAAAAAGTTCCGATTTTAAACAAAGCCCGCT  
3360 CCCGTAAGTCAGCGTAATGCTCTGCCAGTGTACAACCAATTAACCAATTTCTGATTAGAAAAAATCATCGAGCATCAAAATGAAACTGCAATTTATCATATCAGGATTA  
271 F F E D L M L H F Q L K N M D P N  
3470 TCAATACCATATTTTTGAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACGGGAGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTTCTGGATTCCGACTCGTCC  
253 D I G Y K Q F L R K Q L S P S F E G L A L C N W L I A L D Q Y R D A I G V R G  
3580 AACATCAATCAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAAGAACTCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAAGATGGCAAAAAGCTTATGATTT  
217 V D I C G I L K G E D F I L N D L S F D G H T V V S D P S F P L L K H M E  
3690 CTTTCCAGACTTGTCAACAGGCCAGCCATTACGCTGTCTCAAAAATCACTCGCATCAACCAACCGTTATTCTTCTGTTGCGGCTGAGCGAGACGAAATACGGCA  
180 K W V Q E V P W G N R E D D F D S A D V L G N N M R S Q A Q A L R F V R

Figura 17b (con.)

3800 TCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATATTCCTTAATACCTG  
 143 D S N F P C N C V P I S H L R R L F V A L A D V I N E G S D P Y E E L V Q  
 3910 GAATGCTGTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTC  
 107 F A T K G P I A T T L L W A D D P T R I F H K I T P L P M F E T L W N L R  
 4020 TGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGC  
 70 V M E D T V D N A V S G K G H K L F L E P A D P K G Y L R Y I T A G S Q  
 4130 CCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCT  
 33 G V N D R A W K Y G Y L D A D M N S N L R P R S C S T E R Q I H S M  
 4240 TGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTCCCCCCCC  
 4350 CCCATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAACAATAAGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTG  
 4460 CCACCTGACGCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCAGGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGTACGGTGAAAAACCTCTG  
 4570 ACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTA  
 4680 ACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGATTGGCTATTGG

Figura 18a

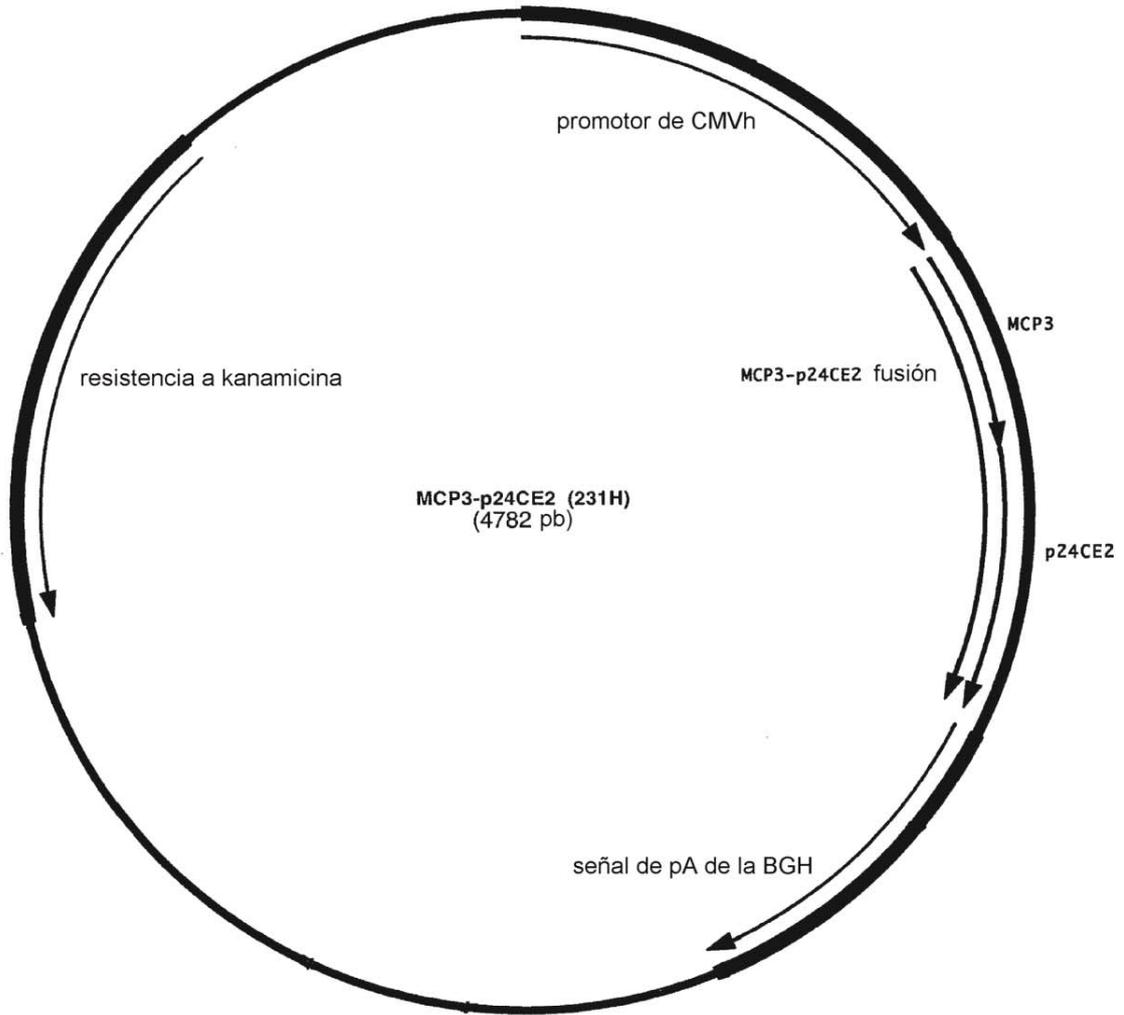


Figura 18b

1 CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTA  
101 TTAATAGTAATCAATACGGGGTCATTAGTTCCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGCCCCGCTGGTGACCCGCCAAC  
201 GACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGTGGAGTATTTACGGTAAACTG  
301 CCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGATGGTAAATGCCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGAC  
401 CTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGG  
501 TTTGACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGAGTTTGTGGACCAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGCTGTAACAACT  
601 CCGCCCCATTGACGCAAAATGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTTCTATAAGCAGAGCTCGTTTGTAGTAAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCC  
701 ACGCTGTTTGGACTCCATAGAAGACACCGGACCGATCCAGCTCCCGGGGcgcgctcgacaagaa ATG TGG AAG CCG ATG CCC TCG CCA  
1M W K P M P S P  
1M W K P M P S P  
793 AGC AAC ATG AAG GCG TCC GCC GCG CTC CTG TGC CTC CTC ACG GCC GCG GCT TTC AGC CCC CAG GGG CTC GCG  
9S N M K A S A A L L C L L L T A A A F S P Q G L A  
9S N M K A S A A L L C L L L T A A A F S P Q G L A  
868 CAG CCG GTC GGG ATC AAC ACG AGC ACC TGC TGC TAC CGG TTC ATC AAC AAG AAG ATC CCG AAG CAG CGT CTG  
34Q P V G I N T S T T C C Y R F I N K K I P K Q R L  
34Q P V G I N T S T T C C Y R F I N K K I P K Q R L  
943 GAG AGC TAC CGC CGG ACC ACG TCG AGC CAC TGC CCG CGG GAG GCG GTC ATC TTC AAG ACG AAG CTG GAC AAG GAG  
59E S Y R R T T S S H C P R E A V I F K T K L D K E  
59E S Y R R T T S S H C P R E A V I F K T K L D K E  
1018 ATC TGC GCC GAC CCG ACG CAG AAG TGG GTT CAG GAC TTC ATG AAG CAC CTG GAC AAG AAG CCG AAG CCG GAG  
84I C A D P T Q K W V Q D F M K H L D K K T Q T P K  
84I C A D P T Q K W V Q D F M K H L D K K T Q T P K  
1093 CTG GTC ATC CCG ATG TTC ACG GCG CTC AGC GAG GGA GCG ACG CCG CAG GAC CTG AAC GCG GCC GTC GGA GGT CAC  
109L V I P M F T A L S E G A T P Q D L N A A V G G H  
109L V I P M F T A L S E G A T P Q D L N A A V G G H  
1168 CAG GCA GCG ATG CAG ATG CTG AAG GAG ACG ATC AAC GAG GAG GCG GCC GAG TGG GAC CGG GCG GCA GCC GAG CCA  
25Q A A M Q M L K E T I N E E A A E W D R A A A E P  
134Q A A M Q M L K E T I N E E A A E W D R A A A E P  
1243 CGC GGT TCC GAC ATC GCG GGC ACC ACC TCG ACG CTC CAG GAG CAG ATC GCG TGG GCC GCA GCT AAG CGC TGG ATC  
50R G S D I A G T T S T L Q E Q I A W A A K R W I  
50R G S D I A G T T S T L Q E Q I A W A A K R W I  
159R G S D I A G T T S T L Q E Q I A W A A K R W I  
1318 ATC CTC GGG CTG AAC AAG ATC GTC CGG ATG TAC AGC CCG GTC TCG ATC GCT AAG TAC GTT GAC CGG TTC TTC  
75I L G L N K I V R M Y S P V S I A A K Y V D R F F  
184I L G L N K I V R M Y S P V S I A A K Y V D R F F  
1393 AAG ACC CTG AGG GCG GAG CAG GCG GGA CTG GAG GAG ATG ATG ACC GCG TGC CAG GGG GTC GTT GGA CCA TCG  
100K T L R A E Q A A G L E E M M T A C Q G V G G P S  
209K T L R A E Q A A G L E E M M T A C Q G V G G P S  
1468 CAC AAG GCC GCG CTC TCG CCG GCG ACG CTG AAC GCG TGG GTG AAG GTC TGA TAA gaattcgggatcggttaacggatcc  
125H K A A L S P R T L N A W V K V \* \*  
234H K A A L S P R T L N A W V K V \* \*  
1550 agATCTGCTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCGTGCCTTCTTGAACCTGGAAAGTGCCACTCCCACTGTCTTTCTTAAT  
1650 AAAATGAGAAATTGCATCGATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGAAGACAATAG  
1750 CAGGCATGCTGGGATGCGGTGGGCTCTATGGTACCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTTCCTCTGGGCAGAAAAGCAGGCACATCCCTTCTC  
1850 TGTGACACACCTGTCCAGCCCTGTTCTTAGTTCACGCCCATCATAGGACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCTTCAATCCACCCCGCTAAAG  
1950 TACTTGGAGGGTCTCTCCCTCCCTCATCGCCACCAACCAACCTAGCCTCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTGCAGAG  
2050 GGAGAGAAATGCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAATCATAAATTTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTGGTCTGGCT  
2150 GCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCCGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACCGAGGAAAGAACATGTAGGCAAAGGCCAGCAAAAG  
2250 GCCAGAACCGTAAAAAGGCGGGTGTGCGGTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAATAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAA  
2350 ACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCTGGAAGTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTT  
2450 TCTCCCTTCGGGAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGTTCCGCTCCAAAGTGGGCTGTGTCAGCAACCC  
2550 CCCGTTACGCCCCAGCGCTGCGCTTATCCGTAACATCTGCTTGAAGTCCAAACCGGTAAGACAGCACTTATCGCCACTGCGAGCAGCCACTGTAACA  
2650 GGATTAGCAGAGCGAGGTATGAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAAGAAGCAGTATTTGGTATCTGCGCTCT  
2750 GCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGGTTGGTAGCTCTTGTATCCGCAACCAACCCAGCGTGGTAGCGGTGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATT  
2850 ACGCCGAGAAAAAGGATCTCAAGAAGATCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGA  
2950 GATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCAAAATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCA  
3050 ATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTTATCCATAGTTGCTGACTCGGGGGGGGGCGCTGAGGTCTGCCCTGTGAA  
3150 GAAAGTGTGCTGACTCATAACGCGCTGAATCGCCCATCATCCAGCCAGAAAGTGGAGGAGCCAGGTTGATGAGAGCTTTGTTGAGGTGGACCAT  
3250 TGGTATTTTGAACCTTTGCTTGGCACGGAACGGTCTGCTTGTGCGGAAGATGCTGATCTGATCTTCAACTCAGCAAAAGTTCGATTTATTCAACA  
3350 AAGCCCGCTCCGTCAGTCAGCGTAATGCTCTGCGAGTGTACAACCAATTAACCAATTTGATTAGAAAAACTCATCGAGCATCAATGAAACTGCA  
271 F F E D L M L H F Q L  
3450 ATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGAGTTCCATAGGATGGCAAGATC  
260K N M D P N D I G Y K Q F L R K Q L S P S F E G L C N W L I A L D  
3550 CTGGTATCGGTCGAGTCCGACTCGTCCACATCAATCAACCTATTAATTTCCCTCTGCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTG  
227Q Y R D A I G V R G V D I C G I L K G E D F I L N D L S F D G H T  
3650 ACGACTGAATCCGGTGAAGTGGCAAAAGCTTATGCATTTCTTCCAGACTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCAAAAATCACTCGCATCAA  
193V Y S D P S F P L L K H M E K W V Q E V P W G N R E D F D S A D V  
3750 CCAAAACCGTATTCTTCTGATTTGCGCTGAGCGAGACAAATACGGGATCGCTGTTAAAAGGCAAAATCAAAAAGGAAATCAAAACCGGCGAG  
160L G R N M R S Q A Q A L R F V R D S N F P C N C V P I S H L R R L  
3850 GAACACTGCGAGGCATCAACAAATTTTACCTGAATCAGGATATTTCTTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCGGGGATCGAGTGGTGAATACCAT  
127F V A L A D V I N E G S D P Y E E L V Q F A T K G P I A T T L L W

Figura 18b (con.)

3950 GCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAA  
 934A D D P T R I F H K I T P L P M F E T L W N L R V M E D T V D N A V  
 4050 CGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCGACATTATCGCGAGCCCA  
 604 S G K G H K L F L E P A D P K G Y L R Y I T A G S Q G V N D R A W  
 4150 TTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGATTACTG  
 274 K Y G Y L D A D M N S N L R P R S C S T E R Q I H S M  
 4250 TTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTGGCTTTCCCCCCCC  
 4350 CCCATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCC  
 4450 CCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCTTTCGGT  
 4550 GATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCTCAG  
 4650 CGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTA ACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGT  
 4750 AAGGAGAAAAATACCGCATCAGATTGGCTATTGG

**Figura 19 a**

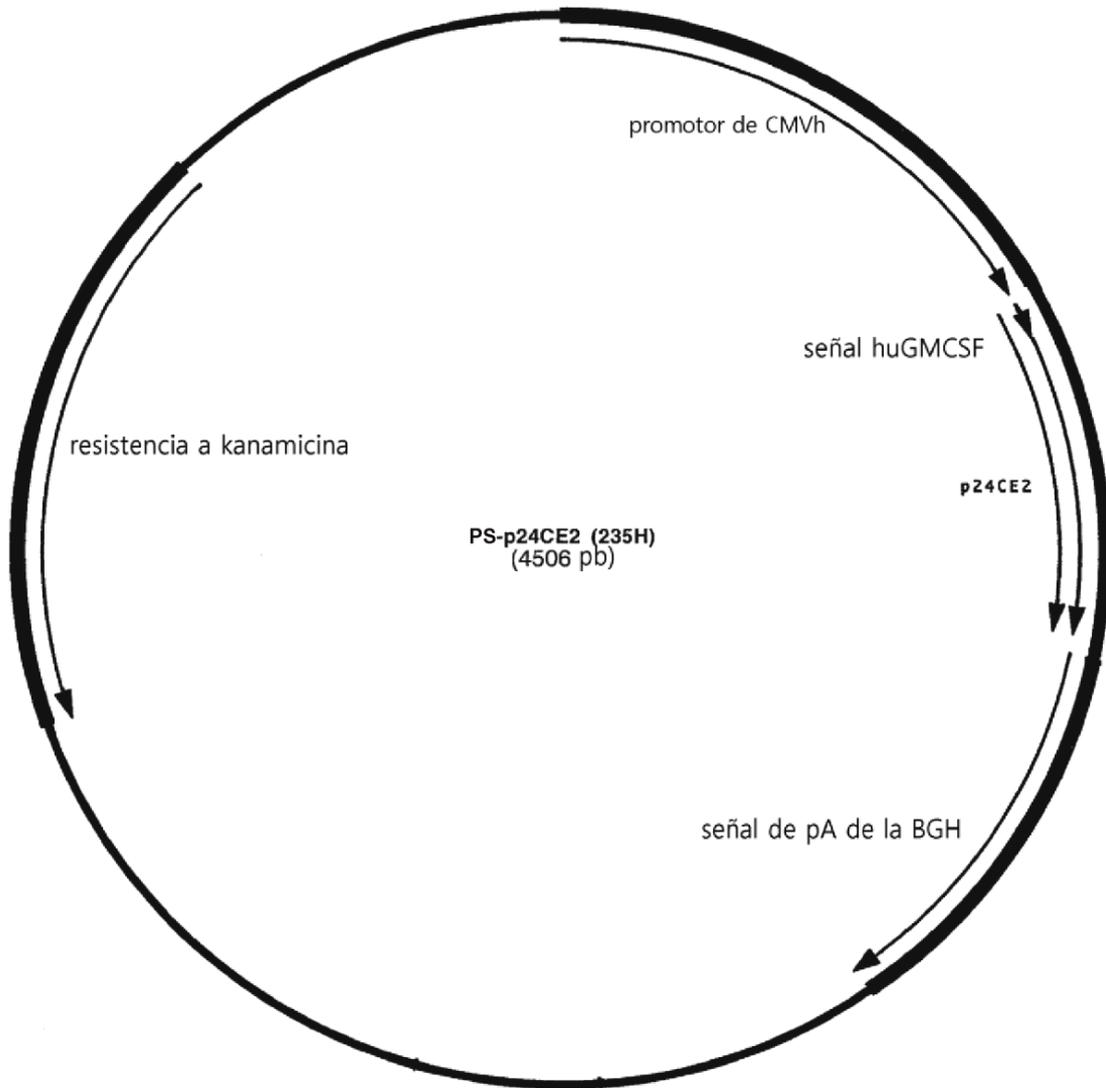


Figura 19b

1 CCTGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTATATGGCTCATGTCCAACATTACGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAA  
111 TCAATTACGGGGTATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCATTGACGTC  
221 AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGCTCAATGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATA  
331 TGCCAAGTACGCCCCATTGACGCTCAATGATGTTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTA  
441 GTCATCGTATTACCATGGTGTGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGCTCAATGGGAG  
551 TTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCAAATGTCTGAACAACTCCGCCCATTTGACGCAAAATGGCGGTAGGCGTGTACGTTGGGAGGTTCTATATAAGCAGAG  
661 CTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGcgcgcgcgacaagaa  
769 ATG TGG CTC CAG AGC CTG CTA CTC CTG GGG ACG GTG GCC TGC AGC ATC TCG GTC ATC CCG ATG TTC ACG GCG CTC AGC GAG  
1 M W L Q S L L L L L G T V A C S I S 1 V I P M F T A L S E  
1 M W L Q S L L L L L G T V A C S I S V I P M F T A L S E  
850 GGA GCG ACG CCG CAG GAC CTG AAC GCG GCC GTC GGA GGT CAC CAG GCA GCG ATG CAG ATG CTG AAG GAG ACG ATC AAC GAG  
11 G A T P Q D L N A A V G G H Q A A M Q M L K E T I N E  
28 G A T P Q D L N A A V G G H Q A A M Q M L K E T I N E  
931 GAG GCG GCC GAG TGG GAC CGG GCG GCA GCC GAG CCA CGC GGT TCC GAC ATC GCG GGC ACC ACC TCG ACG CTC CAG GAG CAG  
38 E A A E W D R A A A E P R G S D I A G T T S T L Q E Q  
55 E A A E W D R A A A E P R G S D I A G T T S T L Q E Q  
1012 ATC GCG TGG GCC GCA GCT AAG CGC TGG ATC ATC CTC GGG CTG AAC AAG ATC GTC CGG ATG TAC AGC CCG GTC TCG ATC GCT  
65 I A W A A A K R W I I L G L N K I V R M Y S P V S I A  
82 I A W A A A K R W I I L G L N K I V R M Y S P V S I A  
1093 GCT AAG TAC GTT GAC CGG TTC TTC AAG ACC CTG AGG GCC GAG CAG GCG GCC GGA CTG GAG GAG ATG ATG ACC GCG TGC CAG  
92 A K Y V D R F F K T L R A E Q A A G L E E M M T A C Q  
109 A K Y V D R F F K T L R A E Q A A G L E E M M T A C Q  
1174 GGG GTC GGT GGA CCA TCG CAC AAG GCC GCG CTC TCG CCG CGC ACG CTG AAC GCG TGG GTG AAG GTC TGA TAA gaattcgggatat  
119 G V G G P S H K A A L S P R T L N A W V K V • •  
136 G V G G P S H K A A L S P R T L N A W V K V • •  
1260 cggttaccggatccAGATCTGCTGCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTCCCTCCCGTGGCTTCTTGAACCTGGAAGTGCCACTCCCCTGCTTTCC  
1370 TAATAAAATGAGGAAATTCATCGCATTGCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCA  
1480 TGCTGGGGATGCGGTGGGCTCATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGACCCGGTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGACACATCCCTTCTCTGTGACACACCCCTGTC  
1590 CACGCCCTGGTCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGCTCCGCTTCAATCCACCCGCTAAAGTACTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTC  
1700 ATCAGCCCAACCAAACTAGCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTGCAGAGGGAGAGAAAATGCCCAACATGTGAGGAAGTAATG  
1810 AGAGAATCATAGAATTTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTGGTCTGGCTGGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATAACGGTTATCC  
1920 ACAGAATCAGGGGATAACCGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGGTGGCGTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC  
2030 TGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAAGGTGGCGAAACCGACAGGACTATAAAGATACCGAGGCTTTCCCTCGAAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCT  
2140 CGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTTCCGGGAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTGGTGTAGGTCGTTCCGCTC  
2250 AAGCTGGGCTGTGTGACGAAACCCCGTTACGCGGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAAGTCAACCCGGTAAGACAGGACTTATCGCCACTGGCAGC  
2360 AGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTCTACAGGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTCGG  
2470 CTCTGCTGAAGCAGTTACCTTCGGAAGAGAGTTGGTAGCTTGTATCCGGCAAAACAAACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTGGTTTGAAGCAGCAGATTACCGCGC  
2580 AGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCTTTGATCTTTTCAAGGGTCTGACCTCAGTGGAAACGAAACTCAGCTTAAAGGATTTTGGTCATGAGATTCAAAAAGGAT  
2690 CTTCACCTAGATCTTTAAATAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGTTAATCAGTAGGACCTATCT  
2800 CAGCGATCTGCTATTTCTCATCATAGTTGCTGACTCGGGGGGGGGGCGTGGGTTGCTCTGTAAGAGGTTGCTGACTCATACCGGCTGAATCGCC  
2910 CCATCATCCAGCAGAAAGTGGGGAGCCAGGTTGATGAGAGCTTTGTTGAGTGGACAGTGGTGGTTTTGAACTTTTCTTGGCCAGGACGGTCTGCGTTGTC  
3020 GGGAGATGCGTGTATCTGCTTCACTCAGCAAAAGTTCGATTTATCAACAAAGCCCGCTCCGCTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCTGCTGCAAGTGTACAACCAATTAAC  
3130 CAATTCTGATTAGAAAAACTCATCGAGCATCAATGAAACTGCAATTTATCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAA  
271 F F E D L M L H F Q L K N M D P N D I G Y K Q F L R K Q L S P S F  
3240 ACTCACCGAGCGTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACTCAATCAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTA  
238 E G L C N W L I A L D Q Y R D A I G V R G V D I C G I L K G E D F I L N  
3350 TCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAAGTGGCAAAAGCTTATGCAATTTCTTTCCAGACTTGTTCACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAA  
201 D L S F D G H T V V S D P S F P L L K H M E K W V Q E V P W G N R E D D F  
3460 ATCACTCGCATCAACCAACCGTTATTCATTCTGATTGCGCTGAGCGAGACAAATACCGGATCGCTGTTAAAGGACAATTAACAACAGGAATCGAATCGAACCCGG  
165 D S A D V L C G N M R S Q A Q A L R F V R D S N F P C N C V P I S H L R R  
3570 GCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACTGAATCAGGATATTTCTTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCGGGGATCGAGTGGTGAACCATGCATCA  
128 L F V A L A D V I N E G S D P Y E E L V Q F A T K G P I A T T L L W A D  
3680 TCAGGAGTACGGATAAAATGTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAAATCCGTCAGCCAGTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATG  
91 D P T R I F H K I T P L P M F E T L W N L R V M E D T V D N A V S G K G H  
3790 TTTCAAAAACACTCGGCGCATCGGCTCCCATACAATCGATAGATTGCGCACTGATTGCCGAGCATTATCGGAGCCATTATCCCATATAAAATCAGCATCCA  
55 K L F L E P A D P K G Y L R Y I T A G S Q G V N D R A W K Y G Y L D A D M  
3900 TGTTGGAATTAATCGCGGCTCGAGCAAGACGTTTCCGTTGAAATATGGCTATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGAT  
18 N S N L R P R S C S T E R Q I H S M  
4010 ATATTTTATCTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGGAGACACAGCTGGCTTTCCCGCCCCCATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGCTCATGAGCGGATA  
4120 CATATTTGAATGATTTGAAAAATAAACAAATAGGGTTCGCGCACATTTCCCGCAAAAGTCCACTGACGCTCAAGAACCATTAATCATGACATTAACCTATA  
4230 AAAATAGCGTATCAGAGGCCCTTTCGCTCCTCGGCTTTCGGTGTGACGCTGAAAACCTCTGACACATGACGCTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGAAGCGGAT  
4340 GCCGGGAGCAGCAACCCGCTCAGCGGCTGACGCGGTTGGCGGTTGGCGGTTGGCTTAACTATCGCGCATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGACCATATGCG  
4450 GTGTAAATCCGCAGATGCGTAAGGAGAAAATCCGCTCAGATTGGCTATTG

Figura 20

Ensayo de tres estrategias de vacunación de sensibilización y refuerzo

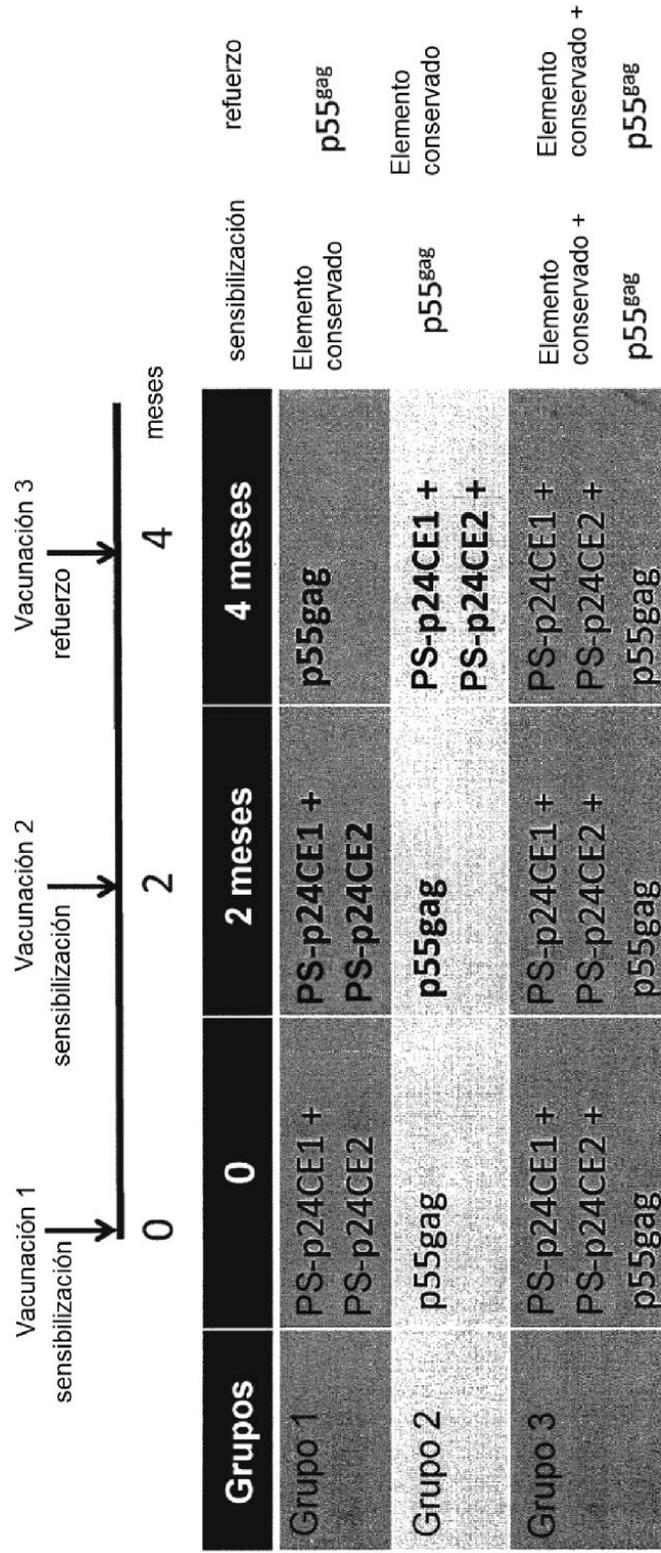


Figura 21

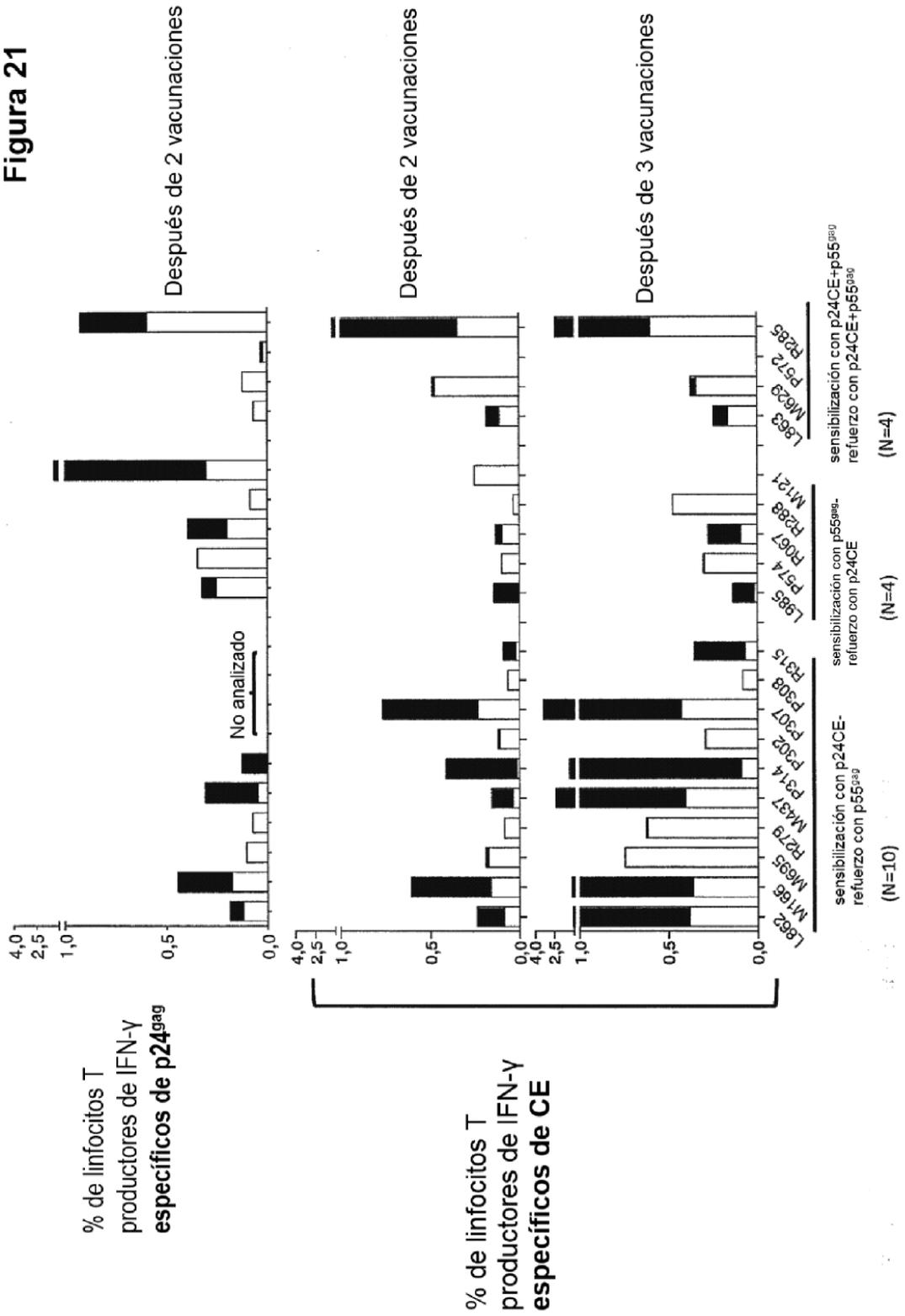


Figura 22

Análisis de respuestas inmunitarias inducidas por CE individuales en cada uno de los animales

Número de CE  
con respuestas inmunitarias  
celulares positivas  
por animal

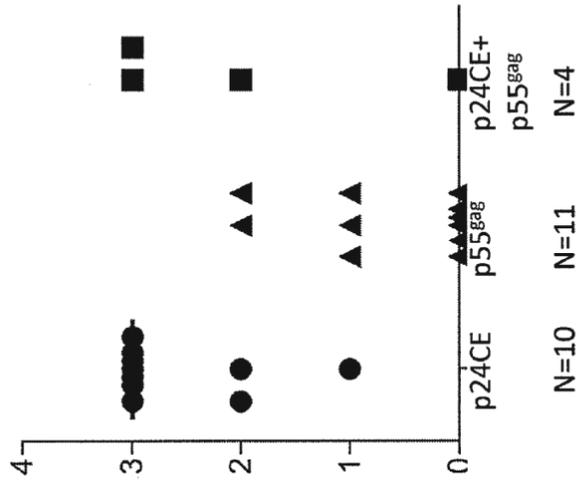


Figura 23

Diferentes estrategias de vacunación inducen niveles similares de anticuerpos contra p27<sup>gag</sup>

