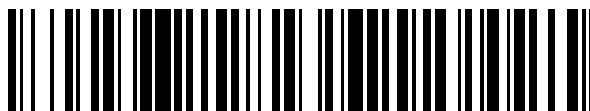


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 676**

51 Int. Cl.:

C07K 14/16 (2006.01)
C07K 14/445 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/015 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/21 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C07K 14/35 (2006.01)
A61K 39/35 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2008** **E 15193141 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019** **EP 2998316**

54 Título: **Procedimiento novedoso y composiciones**

30 Prioridad:

02.03.2007 US 892714 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2020

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

VOSS, GERALD HERMANN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 744 676 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

Procedimiento novedoso y composiciones

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones de vacunas novedosas y a su uso en la estimulación de respuestas inmunitarias en mamíferos, especialmente en seres humanos, y en particular para la prevención y el tratamiento de la infección por patógenos, específicamente *Mycobacterium spp.* En particular, se refiere a composiciones que pueden inducir respuestas de linfocitos T CD4+ y CD8+, además de respuestas de anticuerpos en sujetos sin recurrir a complejos programas de dosis de sensibilización-refuerzo.

Antecedentes a la invención

10 Los organismos completos inactivados se han usado en la vacunación satisfactoria desde finales del siglo diecinueve. En tiempos más recientes se han empleado vacunas que implican la administración de extractos, subunidades, toxoides y polisacáridos capsulares. Desde que están disponibles las técnicas de ingeniería genética, el uso de proteínas recombinantes ha sido una estrategia favorecida, obviándose muchos de los riesgos asociados al uso de proteínas purificadas a partir de fuentes naturales.

15 Las soluciones tempranas de vacunas se basaron en la administración de proteínas que estimulaban algún aspecto de la respuesta inmunitaria *in vivo*. Posteriormente se apreció que las respuestas inmunitarias también podrían fomentarse mediante la administración de ADN que podría transcribirse y ser traducido por el huésped en una proteína inmunógena.

20 La respuesta inmunitaria de los mamíferos tiene dos componentes clave: la respuesta humoral y la respuesta mediada por células. La respuesta humoral implica la generación de anticuerpos circulantes que se unirán al antígeno para el que son específicos, neutralizando así el antígeno y favoreciendo su posterior eliminación mediante un procedimiento que implica otras células que son o citotóxicas o fagocíticas. Los linfocitos B son responsables de la generación de anticuerpos (linfocitos B del plasma), además de conservar la memoria humoral inmunológica (linfocitos B de memoria), es decir, la capacidad para reconocer un antígeno algunos años después de la primera
25 exposición a él, por ejemplo mediante vacunación. La respuesta mediada por células implica la interacción de numerosos tipos diferentes de células, entre los que están los linfocitos T. Los linfocitos T se dividen en varios subconjuntos diferentes, principalmente en linfocitos T CD4+ y CD8+.

30 Las células presentadoras de antígeno (CPA) tales como macrófagos y células dendríticas actúan como centinelas del sistema inmunitario, examinando el cuerpo con respecto a xenoantígenos. Si las CPA detectan xenoantígenos extracelulares, estos antígenos son fagocitados (envueltos) dentro de las CPA, en donde se transformarán en péptidos más pequeños. Estos péptidos se presentan posteriormente en moléculas de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC II) en la superficie de las CPA, en las que pueden ser reconocidos por linfocitos T específicos para antígenos que expresan las moléculas superficiales de CD4 (linfocitos T CD4+). Si los linfocitos T CD4+ reconocen el antígeno para el que son específicos en moléculas de MHC II en presencia de señales
35 coestimuladoras adecuadas adicionales, estas se activan y secretan una colección de citocinas que posteriormente activan los otros brazos del sistema inmunitario. En general, los linfocitos T CD4+ se clasifican en el subconjunto 1 de linfocitos T colaboradores (Th1) o 2 de linfocitos T colaboradores (Th2) dependiendo del tipo de respuesta que generan tras el reconocimiento del antígeno. Con el reconocimiento de un complejo péptido-MHC II, los linfocitos T CD4+ Th1 secretan interleucinas y citocinas tales como interferón gamma, activándose así los macrófagos para que liberen productos químicos tóxicos tales como óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno/nitrógeno. IL-2 y TNF-
40 alfa también se catalogan comúnmente como citocinas Th1. A diferencia, los linfocitos T CD4+ Th2 secretan generalmente interleucinas tales como IL-4, IL-5 o IL-13.

45 Otras funciones de los linfocitos T CD4+ de linfocitos T colaboradores incluyen ayudar a activar los linfocitos B para producir y liberar anticuerpos. También pueden participar en la activación de los linfocitos T CD8+ específicos para antígenos, el otro gran subconjunto de linfocitos T junto con los linfocitos T CD4+.

50 Los linfocitos T CD8+ reconocen el péptido para el que son específicos cuando está presente en la superficie de una célula huésped mediante moléculas de la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I) en presencia de señales coestimuladoras apropiadas. Con el fin de estar presente en moléculas de MHC I, un xenoantígeno necesita acceder directamente dentro de la célula (el citosol o núcleo), tal como es el caso cuando un virus o bacterias intracelulares penetran directamente en una célula huésped o después de vacunación con ADN. Dentro de la célula, el antígeno se transforma en pequeños péptidos que se cargarán en moléculas de MHC I que se redirigen a la superficie de la célula. Con la activación, los linfocitos T CD8+ secretan una colección de citocinas tales como interferón gamma que activa macrófagos y otras células. En particular, un subconjunto de estos linfocitos T CD8+ secreta moléculas líticas y citotóxicas (por ejemplo, granzima, perforina) con la activación. Tales linfocitos T CD8+ se
55 denominan en lo sucesivo linfocitos T citotóxicos.

Más recientemente se ha descrito una ruta alternativa de presentación del antígeno que implica la carga de antígenos extracelulares o fragmentos de los mismos en complejos de MHC I y se ha denominado "presentación

cruzada”.

La naturaleza de la respuesta de los linfocitos T también está influenciada por la composición del adyuvante usado en una vacuna. Por ejemplo, se ha mostrado que los adyuvantes que contienen MPL y QS21 activan linfocitos T CD4+ Th1 para que secreten IFN-gamma (Stewart y col. Vaccine. 2006, 24 (42-43):6483-92).

5 Mientras que los adyuvantes son muy conocidos por tener valor en la mejora de las respuestas inmunitarias frente a antígenos de proteínas, generalmente no se han usado conjuntamente con vacunación con ADN o con vectores basados en ADN. Hay varias hipótesis en cuanto a por qué no se han usado los adyuvantes conjuntamente con vacunas basadas en vectores de ADN. De hecho, las interferencias entre el adyuvante y el vector pueden tener un impacto en su estabilidad. Además, podría esperarse que la adición de un adyuvante a un vector atenuado
10 aumentara la reactividad inducida por tal producto. Finalmente, el aumentar la inmunogenicidad de una vacuna basada en vectores de ADN puede conducir a una respuesta inmunitaria neutralizadora mejorada frente al propio vector, descartándose así cualquier efecto de refuerzo de inyecciones posteriores de la misma vacuna basada en vectores. De hecho, en un protocolo de vacunación dirigido a la protección contra la infección por *P. falciparum*, Jones y col. (2001, J Infect Diseases 183, 303-312) han notificado un resultado adverso después de combinar ADN, proteína recombinante y adyuvante como una composición de refuerzo tras una dosis de sensibilización de ADN. De hecho, los niveles de parasitemia fueron significativamente inferiores en un grupo en el que la composición de refuerzo solo contenía proteína y adyuvante. Se concluyó que el uso de la combinación de ADN, proteína recombinante y adyuvante en este protocolo afectaron adversamente el resultado sobre parasitemia, además de respuestas de anticuerpos.

20 Por otra parte, hay una notificación de mejora de la eficacia de una vacuna de vectores basados en ADN con adyuvante (Ganne y col. Vaccine (1994) 12(13) 1190-1196). En particular, la eficacia mejorada de una vacuna con vector de adenovirus defectuoso en la replicación mediante la adición de adyuvantes de aceite guardó relación con mayores niveles de anticuerpos, pero no se notificó el impacto en las respuestas de linfocitos T CD4 y CD8.

25 En el documento WO2007/016715 se ha descrito el uso de un virus apatógeno como adyuvante. No se mencionó que dicho virus podría contener cualquier polinucleótido heterólogo.

Generalmente se cree que se necesita la estimulación de los linfocitos tanto CD4+ como CD8+ para una inmunidad protectora óptima, especialmente en ciertas enfermedades tales como infección por VIH/SIDA. Se desea la estimulación de los linfocitos tanto CD4+ como CD8+ con el fin de inducir una respuesta inmunitaria óptima bien profiláctica o terapéuticamente. Este es uno de los objetivos principales de las estrategias de vacunación de “dosis de sensibilización-refuerzo”, en las que la administración alterna de vacunas basadas en proteínas (que inducen principalmente linfocitos T CD4+) con vacunas basadas en vectores de ADN, es decir, ADN desnudo, vectores virales o vectores bacterianos intracelulares tales como listeria (que inducen principalmente linfocitos T CD8+) o viceversa, activa más probablemente las respuestas de tanto linfocitos T CD4+ como CD8+.

35 Sin embargo, aunque las estrategias de vacunas de dosis de sensibilización-refuerzo pueden dar lugar generalmente a una respuesta mayor o más equilibrada, la necesidad de vacunar en más de una ocasión y desde luego en más de dos ocasiones puede ser gravoso o incluso inviable, especialmente en los programas de inmunización masiva para el mundo en vías de desarrollo.

Además, como ya se ha mencionado anteriormente, frecuentemente no es posible reforzar el componente del vector viral debido a la inmunidad que haya podido fomentarse frente al propio vector.

40 Por tanto, los objetos de la invención incluyen uno o más de los siguientes: (a) proporcionar un protocolo de vacunación completo y una composición de vacuna que estimule la producción de células CD4+ y/o CD8+ y/o anticuerpos y en particular que evite o mitigue la necesidad de inmunizaciones repetidas; (b) proporcionar un protocolo de vacunación y una composición de vacuna que estimule mejor la producción de células CD4+ y/o células CD8+ y/o anticuerpos con respecto a composiciones de vacunas que contienen un polipéptido inmunógeno solo o un polinucleótido solo o respecto a un protocolo de sensibilización-refuerzo convencional que implica la administración separada de polipéptido y polinucleótido inmunógenos; (c) proporcionar una composición de vacuna que estimule o estimule mejor respuestas de Th1; (d) proporcionar una composición de vacuna y protocolo de vacunación en el que se minimicen las dosis requeridas de componentes, especialmente vectores virales; y (e) proporcionar más generalmente una composición de vacuna útil y protocolo de vacunación para el tratamiento o la prevención de enfermedades producidas por patógenos. Por “estimule mejor” se indica que se potencia la intensidad y/o persistencia de la respuesta.

Sumario de la invención

Por lo tanto, de acuerdo con la invención, se proporciona uno o más primeros polipéptidos inmunógenos para su uso en un procedimiento de fomento de una respuesta inmunitaria frente a *Mycobacterium spp.* en el que los uno o más
55 primeros polipéptidos inmunógenos se administran de manera concomitante con (i) uno o más vectores adenovirales que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más segundos polipéptidos inmunógenos y (ii) un adyuvante que comprende QS21 y 3D-MPL, en el que los uno o más primeros y segundos polipéptidos inmunógenos comprenden los restos 4-725 de la SEQ ID NO: 10, y en el que la expresión “de manera

concomitante” se refiere a que los uno o más primeros y segundos polipéptidos inmunógenos, el uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran dentro de n período de no más de 12 horas, por ejemplo, dentro de un período de no más de 1 hora, normalmente en una ocasión, por ejemplo, en el trascurso de la misma visita al profesional sanitario, por ejemplo, los uno o más primeros y segundos polipéptidos inmunógenos, los uno más vectores adenovirales y el adyuvante se administran de manera secuencial o de manera simultánea.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona uno o más vectores adenovirales que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más segundos polipéptidos inmunógenos derivados de *Mycobacterium spp.* para su uso en un procedimiento de generar una respuesta inmunológica frente a dicho *Mycobacterium spp.* en la que los uno o más vectores adenovirales se administran de manera concomitante con (i) uno o más primeros polipéptidos inmunógenos derivados de dicho *Mycobacterium spp.* y (ii) un adyuvante que comprende QS21 y 3D-MPL, en el que los uno o más primeros y segundos polipéptidos comprenden los restos 4-725 de la SEQ ID NO: 10, y en donde la expresión “de manera concomitante” se refiere a que los uno o más primeros y segundos polipéptidos inmunógenos, los uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran dentro de un período de no más de 12 horas, por ejemplo, dentro de un período de no más de 1 hora, normalmente en una ocasión, por ejemplo, en el trascurso de la misma visita al profesional sanitario, por ejemplo, los uno o más primeros y segundos polipéptidos, los uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran de manera secuencial o simultánea. De acuerdo con otro aspecto específico de la invención, se proporciona una composición de vacuna que comprende (i) uno o más primeros polipéptidos inmunógenos; (ii) uno o más vectores adenovirales que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más segundos polipéptidos inmunógenos; y (iii) un adyuvante que comprende QS21 y 3D-MPL, en el que los uno o más primeros y segundos polipéptidos comprenden los restos 4-725 de la SEQ ID NO: 10.

También se desvela una composición inmunógena que comprende (i) uno o más primeros polipéptidos inmunógenos derivados de un patógeno; (ii) uno o más vectores adenovirales que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más segundos polipéptidos inmunógenos derivados de dicho patógeno; y (iii) un adyuvante.

Dichas vacunas y composiciones inmunógenas estimulan adecuadamente la producción de linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+ y/o anticuerpos, específicos para patógenos.

Por “linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+ y/o anticuerpos, específicos para patógenos” se indican linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+ y/o anticuerpos que reconocen específicamente todo el patógeno o una parte (por ejemplo una subunidad inmunógena) del mismo. Por “reconocen específicamente” se indica que los linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+ y/o anticuerpos reconocen de un modo inmuno-específico en vez de un modo no específico dicho patógeno (o parte del mismo).

También se desvela un procedimiento de estímulo de una respuesta inmunitaria en un mamífero que comprende administrar a un sujeto una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición tal.

También se proporciona el uso de una composición tal en la preparación de un medicamento para estimular una respuesta inmunitaria en un mamífero.

También se proporciona una composición tal para uso en la estimulación de una respuesta inmunitaria en un mamífero.

También se desvela un procedimiento de estímulo de la producción de linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+ y/o anticuerpos específicos para patógenos en mamíferos que comprende administrar a dicho mamífero (i) uno o más primeros polipéptidos inmunógenos derivados de un patógeno; (ii) uno o más vectores adenovirales que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más segundos polipéptidos inmunógenos derivados de dicho patógeno; y (iii) un adyuvante; en el que el uno o más primeros polipéptidos inmunógenos, el uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran simultáneamente, por ejemplo mediante administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de una composición anteriormente dicha.

También se proporciona el uso de las composiciones anteriormente dichas en la preparación de un medicamento para estimular la producción de células CD4+ y/o CD8+ y/o anticuerpos específicos para patógenos en mamíferos.

Por ejemplo, se estimula la producción de linfocitos T CD4+ o linfocitos T CD8+ o anticuerpos.

Adecuadamente se estimula producción de 2 y especialmente 3 de linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+ y/o anticuerpos.

Adecuadamente se estimula la producción de linfocitos T CD8+. Adecuadamente se estimula la producción de linfocitos T CD4+ y CD8+. Adecuadamente se estimula la producción de linfocitos T CD4+ y CD8+ y anticuerpos.

Alternativamente, adecuadamente se estimula la producción de linfocitos T CD4+. Adecuadamente se estimula la producción de CD4+ y anticuerpos.

Alternativamente, adecuadamente se estimula la producción de anticuerpos.

Los procedimientos de la divulgación están previstos adecuadamente para proporcionar las etapas adecuadas para un procedimiento completo para fomentar una respuesta inmunitaria (aunque, si se desea, el procedimiento puede repetirse). Por tanto, adecuadamente, los procedimientos desvelados no implican el uso de una dosis de sensibilización de cualquier polipéptido o polinucleótido inmunógeno (por ejemplo, en forma de un vector tal como un vector adenoviral) que codifique cualquier polipéptido inmunógeno.

Por ejemplo, se desvela un procedimiento de fomento de una respuesta inmunitaria frente a un patógeno que está constituido por (a) administrar (i) uno o más primeros polipéptidos inmunógenos derivados de dicho patógeno; (ii) uno o más vectores adenovirales que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más segundos polipéptidos inmunógenos derivados de dicho patógeno; y (iii) un adyuvante; en el que el uno o más polipéptidos inmunógenos, el uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran simultáneamente; y (b) opcionalmente repetir las etapas de (a).

Las etapas del procedimiento pueden repetirse (por ejemplo, repetirse una vez) si una repetición da lugar a una respuesta inmunitaria mejorada. Puede obtenerse una respuesta adecuada, al menos en lo que se refiere a una respuesta de linfocitos T, sin necesidad de repetición.

También se desvela un procedimiento de fomento de una respuesta inmunitaria frente a un patógeno que comprende (a) administrar (i) uno o más primeros polipéptidos inmunógenos derivados de dicho patógeno; (ii) uno o más vectores adenovirales que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más segundos polipéptidos inmunógenos derivados de dicho patógeno; y (iii) un adyuvante; en el que el uno o más primeros polipéptidos inmunógenos, el uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran simultáneamente; y en el que el procedimiento no implica administrar una dosis de sensibilización de polipéptido o polinucleótido inmunógenos que codifique polipéptido inmunógeno.

También se proporciona un kit que comprende (i) uno o más primeros polipéptidos inmunógenos derivados de *Mycobacterium spp*; (ii) uno o más vectores adenovirales que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más segundos polipéptidos inmunógenos derivados de *Mycobacterium spp*; y (iii) un adyuvante que comprende QS21 y 3D-MPL, en el que los uno o más primeros y segundos polipéptidos comprenden los restos 4-725 de la SEQ ID NO: 10, y en el que los uno o más primeros y segundos polipéptidos inmunógenos, los uno o más vectores adenovirales y el adyuvante son para la administración de manera concomitante, en la que la expresión "de manera concomitante" se refiere a que los uno o más primeros y segundos polipéptidos inmunógenos, los uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran dentro de un período de no más de 12 horas, por ejemplo, dentro de un período de no más de 1 hora, normalmente en una ocasión, por ejemplo, en el transcurso de la misma visita al profesional sanitario, por ejemplo los uno o más primeros y segundos polipéptidos inmunógenos, los uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran de manera secuencial o de manera simultánea.

Las composiciones y procedimientos de la invención pueden ser útiles para la prevención de infección por patógenos en sujetos sin tratamiento previo, o la prevención de que se vuelvan a infectar sujetos que previamente se habían infectado por patógenos o el tratamiento de sujetos que se han infectado por patógenos.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra una representación gráfica de la construcción del plásmido p73i-Tgrn

Las Figuras 2-8 muestran los resultados de experimentos tratados en el Ejemplo 1, específicamente:

Las Figuras 2a, 2b, 3a, 3b: respuestas de linfocitos T CD4+ y CD8+ en respuesta a reestimulación por mezclas de péptidos derivados de p24, RT, Nef y p17 tras diversos protocolos de inmunización y en diferentes momentos;

Figura 4: respuestas de anticuerpos frente a F4;

Las Figuras 5-8 respuestas de anticuerpos frente a componentes de F4 p24, RT, p17 y Nef, respectivamente;

La Figura 9 muestra los resultados de experimentos tratados en el Ejemplo 2, específicamente: respuestas de linfocitos T CD4+ en respuesta a reestimulación por mezclas de péptidos derivados de p24 y RT tras diversos protocolos de inmunización;

Las Figuras 10-12 muestran los resultados de experimentos tratados en el Ejemplo 3, específicamente:

La Figura 10 muestra la respuesta linfoproliferativa de CMSP de conejo frente a mezclas de péptidos que incluyen la secuencia de F4;

La Figura 11 muestra la evolución temporal de respuestas de anticuerpos frente a F4;

Las Figuras 12a y 12b muestra respuestas de anticuerpos (en el día 77) frente a componentes de F4 p24 y RT, respectivamente;

- La Figura 13 muestra la cuantificación de linfocitos T CD4 específicos para VIH-1;
- La Figura 14 muestra distribución de la frecuencia de linfocitos T CD4 específicos para F4 7 días después de dos inmunizaciones;
- 5 La Figura 15 muestra la producción de citocinas de linfocitos T CD4 específicos para F4 7 días después de dos inmunizaciones;
- La Figura 16 muestra la cuantificación de linfocitos T CD8 específicos para VIH-1;
- La Figura 17 muestra la producción de citocinas de linfocitos T CD8 específicos para F4 7 días después de dos inmunizaciones;
- La Figura 18 muestra la cuantificación de linfocitos T CD4 específicos para CSP;
- 10 La Figura 19 muestra la cuantificación de linfocitos T CD8 específicos para CSP;
- La Figura 20 muestra la cuantificación de linfocitos T CD4 específicos para (el extremo N de) CSP;
- La Figura 21 muestra la cuantificación de linfocitos T CD4 específicos para (el extremo C de) CSP;
- La Figura 22 muestra la cuantificación de linfocitos T CD8 específicos para (el extremo N de) CSP;
- La Figura 23 muestra la cuantificación de linfocitos T CD8 específicos para (el extremo C de) CSP;
- 15 La Figura 24 muestra la cuantificación de títulos de anticuerpos específicos para CSP.

Resumen de los listados de secuencias

Descripción del aminoácido o polinucleótido	Identificador de secuencias (SEQ ID No)
Gag-RT-Nef de VIH ("GRN") (subtipo B) (ADNc)	1
Gag-RT-Nef de VIH ("GRN") (subtipo B) (aminoácido)	2
Gag-RT-integrasa-Nef de VIH ("GRIN") (subtipo A) (ADNc)	3
Gag-RT-integrasa-Nef de VIH ("GRIN") (subtipo A) (aminoácido)	4
gp140 de VIH (subtipo A) (ADNc)	5
gp140 de VIH (subtipo A) (aminoácido)	6
gp120 de VIH (subtipo B) (ADNc)	7
gp120 de VIH (subtipo B) (aminoácido)	8
Proteína de fusión M72 de antígenos de TB (ADNc)	9
Proteína de fusión M72 de antígenos de TB (aminoácido)	10
Antígeno derivado de la proteína CS de P. falciparum (ADNc)	11
Antígeno derivado de la proteína CS de P. falciparum (aminoácido)	12
Proteína de fusión "RTS" derivada de la proteína CS de P. falciparum (ADNc)	13
Proteína de fusión "RTS" derivada de la proteína CS de P. falciparum (aminoácido)	14
p24-RT-Nef-p17 de VIH (ADNc)	15
p24-RT-Nef-p17 de VIH (aminoácido)	16

- 20 Las secuencias anteriormente enumeradas 9 y 10 pueden emplearse como polipéptidos o polinucleótidos que codifican polipéptidos útiles en aspectos a modo de ejemplo de la invención. Dichos polipéptidos pueden estar constituidos por o comprender las secuencias anteriormente mencionadas. Los restos de Met iniciales son opcionales. Los restos de His del extremo N (que incluyen restos de His que siguen inmediatamente a una Met inicial, como en SEQ ID No 9) son opcionales o puede emplearse una marca de His del extremo N de una longitud diferente (por ejemplo, normalmente pueden emplearse hasta 6 restos de His para facilitar el aislamiento de la proteína). Pueden emplearse proteínas análogas que tienen identidad de secuencias significativa, por ejemplo superior al 80 %, por ejemplo superior al 90 %, por ejemplo superior al 95 %, por ejemplo superior al 99 %, de identidad de secuencia respecto a la longitud total de la secuencia de referencia, especialmente cuando la proteína análoga tiene una función similar y particularmente cuando la proteína análoga es similarmente inmunógena. Pueden tolerarse, por ejemplo, hasta 20, por ejemplo hasta 10, por ejemplo 1-5 sustituciones (por ejemplo sustituciones conservativas). Pueden emplearse ácidos nucleicos que se diferencian de aquellos enumerados anteriormente que codifican las mismas proteínas, o las proteínas análogas anteriormente mencionadas. La
- 25
- 30 La identidad de secuencias puede determinarse mediante medios convencionales, por ejemplo usando BLAST. En una

variante específica de SEQ ID No 16 que puede mencionarse, el resto 398 es Ser y no Cys.

Descripción detallada de la invención.

5 Como se usa en el presente documento, el término “simultáneamente” significa que el uno o más polipéptidos inmunógenos, el uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran dentro de un periodo no superior a 12 horas, por ejemplo dentro de un periodo no superior a 1 hora, normalmente en una ocasión, por ejemplo en el transcurso de la misma visita al profesional sanitario, por ejemplo, el uno o más polipéptidos inmunógenos, el uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran secuencialmente o simultáneamente.

10 Como se usa en el presente documento, el término “epítopo” se refiere a una secuencia de aminoácidos inmunógenas. Un epítopo puede referirse a una secuencia mínima de aminoácidos de normalmente 6-8 aminoácidos cuya secuencia mínima es inmunógena cuando se retira de su contexto natural, por ejemplo cuando se trasplanta a un polipéptido heterólogo. Un epítopo también puede referirse a esa parte de una proteína que es inmunógena, en la que el polipéptido que contiene el epítopo se denomina el antígeno (o algunas veces “antígeno de polipéptido”). Un polipéptido o antígeno puede contener uno o más epítopos distintos (por ejemplo 2 o 3 o más). El término “epítopo” engloba epítopos de linfocitos B y linfocitos T. El término “epítopo de linfocitos T” engloba epítopos de linfocitos T CD4+ y epítopos de linfocitos T CD8+ (algunas veces también se denominan en lo sucesivo epítopos CTL).

20 El término “polipéptido inmunógeno” se refiere a un polipéptido que es inmunógeno, es decir, que puede provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero, y por tanto contiene uno o más epítopos (por ejemplo epítopos de linfocitos T y/o linfocitos B). Los polipéptidos inmunógenos pueden contener uno o más antígenos de polipéptidos, por ejemplo en una disposición no natural tal como en una proteína de fusión.

Los polipéptidos inmunógenos serán normalmente proteínas recombinantes producidas, por ejemplo, mediante expresión en un huésped heterólogo tal como un huésped bacteriano, en levadura o en células cultivadas de mamíferos.

25 El término “polipéptido derivado de un patógeno” significa un polipéptido que contiene parcialmente o completamente secuencias (es decir, antígenos) que se producen naturalmente en patógenos o poseen un alto grado de identidad de secuencias al mismo (por ejemplo superior al 95 % de identidad respecto a un tramo de al menos 10, por ejemplo al menos 20 aminoácidos).

Los polipéptidos inmunógenos pueden contener uno o más (por ejemplo 1, 2, 3 o 4) antígenos de polipéptidos.

30 A menos que se especifique lo contrario, una “respuesta inmunitaria” puede ser una respuesta celular y/o una humoral.

35 En una realización de la invención, uno o más de dichos uno o más primeros polipéptidos inmunógenos es sustancialmente el mismo que uno o más de dichos uno o más segundos polipéptidos inmunógenos. Por ejemplo, uno del al menos un primer polipéptido inmunógeno y uno del al menos un segundo polipéptido inmunógeno pueden tener una identidad de secuencias global del 90 % o más, por ejemplo del 95 % o más, por ejemplo del 98 % o 99 % o más respecto a la longitud de uno u otro polipéptido inmunógeno.

40 En otra realización de la invención, uno o más de dichos uno o más primeros polipéptidos inmunógenos contiene al menos un antígeno que es sustancialmente el mismo que un antígeno contenido en uno o más de dichos uno o más segundos polipéptidos inmunógenos. Por ejemplo, uno del al menos un primer polipéptido inmunógeno y uno del al menos un segundo polipéptido inmunógeno pueden tener una identidad de secuencias global del 90 % o más, por ejemplo del 95 % o más, por ejemplo del 98 % o 99 % o más respecto a un tramo de 20 aminoácidos o más, por ejemplo 40 aminoácidos o más, por ejemplo 60 aminoácidos o más.

Adecuadamente, uno o más primeros polipéptidos inmunógenos comprenden al menos un epítopo de linfocitos T.

Adecuadamente, uno o más segundos polipéptidos inmunógenos comprenden al menos un epítopo de linfocitos T.

Adecuadamente, el uno o más primeros polipéptidos inmunógenos comprende al menos un epítopo de linfocitos B.

45 Adecuadamente, el uno o más segundos polipéptidos inmunógenos comprende al menos un epítopo de linfocitos B.

En otra realización de la invención, uno o más de dichos uno o más primeros polipéptidos inmunógenos y uno o más de dichos uno o más segundos polipéptidos inmunógenos comparten uno o más epítopos idénticos de linfocitos B y/o linfocitos T. Adecuadamente comparten una o más secuencias idénticas de aminoácidos de 10 aminoácidos de longitud o más, por ejemplo 15 aminoácidos o más, por ejemplo 25 aminoácidos o más.

50 También se desvelan ejemplos en los que ninguno del uno o más de dichos uno o más primeros polipéptidos inmunógenos es sustancialmente el mismo que o contiene algún antígeno en común con uno o más de dichos uno o más segundos polipéptidos inmunógenos, por ejemplo pueden tener una identidad de secuencias global inferior al 90 % durante un tramo de 20 aminoácidos o más, por ejemplo 40 aminoácidos o más, por ejemplo 60 aminoácidos o

más.

Por tanto, pueden no compartir ningún epítipo de linfocitos B o linfocitos T. Por ejemplo, pueden no compartir ninguna secuencia idéntica de aminoácidos de 10 aminoácidos de longitud o más, por ejemplo 15 aminoácidos o más, por ejemplo 25 aminoácidos o más.

5 En una realización específica de la invención, un primer polipéptido inmunógeno y un segundo polipéptido inmunógeno contienen los mismos antígenos en la misma disposición o en una disposición diferente (por ejemplo en una disposición diferente). Por "disposición diferente" se indica que pueden estar dispuestos en un orden diferente y/o pueden estar divididos. En otra realización específica de la invención, un primer polipéptido inmunógeno y un segundo polipéptido inmunógeno son el mismo.

10 La composición según la invención puede contener un primer polipéptido inmunógeno como el único polipéptido inmunógeno en la composición. Alternativamente, la composición según la invención puede contener más de un primer polipéptido inmunógeno, por ejemplo 2 o 3 o 4 o más polipéptidos inmunógenos.

La composición según la invención puede comprender un vector adenoviral. Alternativamente puede comprender más de un vector adenoviral, por ejemplo 2 vectores adenovirales.

15 En composiciones según la invención, un vector adenoviral puede comprender un polinucleótido heterólogo que codifica un segundo polipéptido inmunógeno o puede comprender más de un polinucleótido heterólogo que juntos codifican más de un segundo polipéptido inmunógeno bajo el control de más de un promotor.

Además de para la vacunación profiláctica, las composiciones de la invención también pueden usarse en individuos que ya están infectados con el patógeno, y dan como resultado un control inmunológico mejorado de la infección establecida.

20

Antígenos

Antígenos útiles según la invención son derivados de patógenos, más específicamente *Mycobacterium spp.* Los patógenos incluyen virus, bacterias, protozoos y otros organismos parásitos perjudiciales para los mamíferos, incluyendo el hombre.

25 Los antígenos de polipéptidos adecuados que van a administrarse como polipéptido o polinucleótido que codifican el polipéptido de acuerdo con la presente divulgación incluyen antígenos derivados de VIH (por ejemplo VIH-1), virus del herpes humano (tales como gH, gL, gM, gB, gC, gK, gE o gD o derivados de los mismos o proteína inmediata temprana tal como ICP27, ICP 47, ICP4, ICP36 de VHS1 o VHS2), citomegalovirus, especialmente humano (tal como gB o derivados del mismo), virus de Epstein Barr (tal como gp350 o derivados del mismo), virus de la varicela zóster (tal como gpl, II, III y IE63) o de un virus de la hepatitis tal como virus de la hepatitis B (por ejemplo, antígeno superficial de la hepatitis B, PreS1, PreS2 y proteínas env superficiales, antígeno del núcleo de la hepatitis B o Pol), virus de la hepatitis C (por ejemplo Core, E1, E2, P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y B) y antígeno del virus de la hepatitis E, o de otros patógenos virales tales como paramixovirus: virus respiratorio sincitial (tal como proteínas F y G o derivados de las mismas), o antígenos del virus paragripal, virus del sarampión, virus de la parotiditis, virus del papiloma humano (por ejemplo VPH6, 11, 16, 18, por ejemplo L1, L2, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7), flavivirus (por ejemplo virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus de la encefalitis japonesa) o virus de la gripe (tal como hemaglutina, nucleoproteína, NA o proteínas M o combinaciones de las mismas), o antígenos derivados de patógenos bacterianos tales como *Neisseria spp.*, incluyendo *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis*, por ejemplo, proteínas de unión a transferrina, proteínas de unión a lactoferrina, PilC, adhesinas); *S. pyogenes* (por ejemplo proteínas M o fragmentos de las mismas, proteasa C5A, *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp.*, incluyendo *M. catarrhalis*, también conocida como *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo adhesinas e invasinas de alto y bajo peso molecular); *Bordetella spp.*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo pertactina, toxina pertussis o derivados de las mismas, hemaglutinina filamentosa, adenilato-ciclasa, fimbrias), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp.*, incluyendo *L. pneumophila*; *Escherichia spp.*, incluyendo *E. coli* enterotóxica (por ejemplo factores de colonización, toxina lábil al calor o derivados de la misma, toxina estable al calor o derivados de la misma), *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatógena (por ejemplo toxina similar a toxina shiga o derivados de la misma); *Vibrio spp.*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo toxina del cólera o derivados de la misma); *Shigella spp.*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp.*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo una proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp.*, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo toxinas, adhesinas e invasinas) y *C. coli*; *Salmonella spp.*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp.*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo ureasa, catalasa, toxina vacuolizante); *Pseudomonas spp.*, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetani* (por ejemplo toxina tetánica y derivado de la misma), *C. botulinum* (por ejemplo toxina botulínica y derivado de la misma), *C. difficile* (por ejemplo toxinas A o B de clostridium y derivados de las mismas); *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo toxina botulínica y derivados de la misma); *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo toxina de la difteria y derivados de la misma); *Borrelia spp.*, incluyendo *B.*

5 *burgdorferi* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la ehrliquiosis granulocítica humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*;

10 *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo las proteínas raras de la membrana externa), *T. denticola*, *T. hydovysenteriae*; o derivados de parásitos tales como *Plasmodium spp.*, incluyendo *P. falciparum* y *P. vivax*; *Toxoplasma spp.*, incluyendo *T. gondii* (por ejemplo SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba spp.*, incluyendo *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluyendo *B. microti*; *Trypanosoma spp.*, incluyendo *T. cruzi*; *Giardia spp.*, incluyendo *G. lamblia*; *leishmania spp.*, incluyendo *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*; *Schistosoma spp.*, incluyendo *S. mansoni*, o derivados de levadura tales como *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, incluyendo *C. neoformans*.

15 Otros antígenos bacterianos incluyen antígenos derivados de *Streptococcus spp.*, incluyendo *S. pneumoniae* (PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a colina) y el antígeno de proteína neumolisina (Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins y col., Microbial Pathogenesis, 25, 337-342) y derivados purificados mutantes de los mismos (documentos WO90/06951; WO99/03884). Otros antígenos bacterianos incluyen antígenos derivados de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae* tipo B (por ejemplo PRP y conjugados del mismo), *H. influenzae* no clasificable, por ejemplo OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbrina y péptidos derivados de fimbrina (documento US5.843.464) o variantes de copias múltiples o proteínas de fusión de los mismos.

20 Los procedimientos o composiciones de la presente invención se usan para proteger contra o tratar enfermedades bacterianas tales como aquellas producidas por *Mycobacterium tuberculosis* (TB).

Antígenos de TB

En la presente invención, el patógeno es *Mycobacterium tuberculosis*.

25 Antígenos a modo de ejemplo derivados de *M. tuberculosis* son, por ejemplo alfa-cristalina (HspX), HBHA, Rv1753, Rv2386, Rv2707, Rv2557, Rv2558, RPFs: Rv0837c, Rv1884c, Rv2389c, Rv2450, Rv1009, aceA (Rv0467), ESAT6, Tb38-1, Ag85A, -B α -C, MPT 44, MPT59, MPT45, HSP10, HSP65, HSP70, HSP75, HSP90, PPD 19kDa [Rv3763], PPD, 38kDa [Rv0934], PstS1, (Rv0932), SodA (Rv3846), Rv2031c, 16kDa, Ra12, TbH9, Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, DPPD, mTCC1, mTCC2, hTCC1 (documento WO99/51748) y hTCC2, y especialmente Mtb32a, Ra35, Ra12, DPV, MSL, MTI, Tb38-1, mTCC1, TbH9 (Mtb39a), hTCC1, mTCC2 y DPPD. Antígenos derivados de *M. tuberculosis* también incluyen proteínas de fusión y variantes de las mismas en las que al menos dos o, por ejemplo, tres polipéptidos de *M. tuberculosis*, se fusionan en una proteína mayor. Tales fusiones pueden comprender o están constituidas por Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI (documento WO99/51748), Ra12-Tbh9-Ra35-Ag85B y Ra12-Tbh9-Ra35-mTCC2. SEQ ID No 6 del documento WO2006/117240 define una secuencia de Ra12-Tbh9-Ra35 particular

30 que puede mencionarse junto con variantes en las que Ser 704 de esa secuencia se muta por otro aminoácido distinto de serina, por ejemplo por Ala, y derivados de la misma que incorporan una marca de His en el extremo N de una longitud apropiada (por ejemplo SEQ ID No 2 o 4 del documento WO2006/117240). Véase también SEQ ID No 10, que es una secuencia que contiene una marca M de iniciación opcional y una de His-His en el extremo N opcional (posiciones 2 y 3) y en la que la Ala mutada respecto a Ser de tipo salvaje está en la posición 706.

Antígenos de Chlamydia

En otros ejemplos, el patógeno puede ser, por ejemplo, una *Chlamydia sp.*, por ejemplo *C. trachomatis*.

45 Antígenos a modo de ejemplo derivados de *Chlamydia sp.*, por ejemplo *C. trachomatis*, se seleccionan de CT858, CT089, CT875, MOMP, CT622, PmpD, PmpG y fragmentos de los mismos, SWIB y fragmentos inmunógenos de uno cualquiera de los mismos (tales como PmpDpd y PmpGpd) y combinaciones de los mismos. Combinaciones preferidas de antígenos incluyen CT858, CT089 y CT875. Las secuencias y combinaciones específicas que pueden emplearse se describen en el documento WO2006/104890.

Antígenos de Plasmodium

En otros ejemplos, el patógeno puede ser, por ejemplo, un parásito que produce malaria tal como *Plasmodium sp.*, por ejemplo *P. falciparum* o *P. vivax*.

50 Por ejemplo, los antígenos derivados de *P. falciparum* incluyen proteína del circumsporozoíto (proteína CS), PfEMP-1, antígeno Pfs 16, MSP-1, MSP-3, LSA-1, LSA-3, AMA-1 y TRAP. Un antígeno híbrido particular que puede mencionarse es RTS. RTS es una proteína híbrida que comprende sustancialmente toda la parte del extremo C de la proteína del circumsporozoíto (CS) de *P. falciparum* unida mediante cuatro aminoácidos de la parte preS2 del antígeno superficial de la hepatitis B al antígeno superficial (S) del virus de la hepatitis B. Cuando se expresa en levadura, RTS se produce como una partícula de lipoproteína, y cuando se coexpresa con el antígeno S de VHB produce una partícula mixta conocida como RTS,S. La estructura de RTS y RTS,S se describen en el documento WO93/10152. Los antígenos TRAP se describen en el documento WO90/01496. Otros antígenos de *Plasmodium*

55

incluyen EBA de *P. falciparum*, GLURP, RAP1, RAP2, secuestrina, Pf332, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs48/45, Pfs230 y sus análogos en otras *Plasmodium spp.* Un ejemplo desvelado en el presente documento es una composición que comprende RTS,S o proteína CS o un fragmento de los mismos como la parte de CS de RTS,S en combinación con uno o más antígenos palúdicos adicionales que pueden seleccionarse, por ejemplo, del grupo que está constituido por MSP-1, MSP-3, AMA-1, Pfs 16, LSA-1 o LSA-3. Antígenos posibles de *P. vivax* incluyen proteína del circumsporozoíto (proteína CS) y proteína de unión al antígeno Duffy y fragmentos inmunógenos de las mismas, tales como PvRII (véase, por ejemplo, el documento WO02/12292).

En este ejemplo, el primer y segundo polipéptido inmunógeno se pueden seleccionar de antígenos derivados de *Plasmodium falciparum* y/o *Plasmodium vivax*.

10 Por ejemplo, el primer y/o segundo polipéptido inmunógeno se seleccionan de antígenos derivados de *Plasmodium falciparum* y/o *Plasmodium vivax* se seleccionan de RTS (por ejemplo como RTS,S), proteína del circumsporozoíto (CS), MSP-1, MSP-3, AMA-1, LSA-1, LSA-3 y derivados inmunógenos de los mismos o fragmentos inmunógenos de los mismos.

15 Un derivado específico que puede mencionarse es la proteína híbrida conocida como RTS, especialmente cuando se presenta en forma de una partícula mixta conocida como RTS,S.

En SEQ ID No 14 se muestra una secuencia de RTS a modo de ejemplo.

En SEQ ID No 12 se muestra un antígeno derivado de proteína CS de *P. falciparum* a modo de ejemplo. Esta secuencia particular se corresponde con la secuencia de CSP de *P. falciparum* (cepa 3D7), que también contiene una inserción de 19 aa procedente de la cepa 7G8 (81-100).

20 En otro ejemplo, un primer polipéptido inmunógeno es RTS,S y un segundo polipéptido inmunógeno es la proteína CS de *Plasmodium falciparum* o un fragmento inmunógeno de la misma.

Antígenos de VPH

En otros ejemplos, el patógeno puede ser, por ejemplo, un virus del papiloma humano.

25 Por tanto, antígenos de uso pueden, por ejemplo, derivar del virus del papiloma humano (VPH) considerado responsable de condiloma acuminado (VPH6 o VPH11 y otros) y/o los virus VPH responsables del cáncer de cuello uterino (VPH16, VPH18, VPH33, VPH51, VPH56, VPH31, VPH45, VPH58, VPH52 y otros). En un ejemplo, las formas de las composiciones profilácticas, o terapéuticas, de condiloma acuminado comprenden partículas L1 o capsómeros y proteínas de fusión que comprenden uno o más antígenos seleccionados de las proteínas del VPH E1, E2, E5 E6, E7, L1 y L2. Las formas de la proteína de fusión pueden ser: L2E7 como se describe en el documento WO96/26277 y proteína D (1/3)-E7 descrita en el documento PCT/EP98/05285.

30 Una composición profiláctica o terapéutica preferida para infección o cáncer del cuello uterino por VPH puede comprender antígenos de VPH 16 o 18. Por ejemplo, monómeros del antígeno L1 o L2 o antígenos L1 o L2 presentados juntos como una partícula similar a virus (VLP) o la proteína L1 sola presentada sola en una VLP o estructura de capsómero. Tales antígenos, partículas similares a virus y capsómeros son conocidos en sí. Véanse, por ejemplo, los documentos WO94/00152, WO94/20137, WO94/05792 y WO93/02184. Pueden incluirse proteínas tempranas adicionales solas o como proteínas de fusión tales como E7, E2 o preferentemente E5, por ejemplo, la divulgación particularmente preferida de éstas incluye una VLP que comprende proteínas de fusión L1E7 (documento WO96/11272). En un ejemplo, los antígenos de VPH 16 comprenden las proteínas tempranas E6 o E7 fusionadas con un soporte de proteína D para formar fusiones de proteína D - E6 o E7 procedentes de VPH 16, o combinaciones de las mismas; o combinaciones de E6 o E7 con L2 (documento WO96/26277). Alternativamente, las proteínas tempranas de VPH 16 o 18 E6 y E7 pueden presentarse en una única molécula, preferentemente una proteína D- fusión E6/E7. Una composición tal puede proporcionar opcionalmente cualquiera o ambas proteínas E6 y E7 de VPH 18, preferentemente en forma de una proteína de fusión proteína D - E6 o proteína D - E7 o proteína de fusión proteína D E6/E7. Adicionalmente pueden emplearse antígenos de otras cepas de VPH, preferentemente de cepas VPH 31 o 33.

Antígenos de VIH

En otros ejemplos, el patógeno puede ser, por ejemplo VIH, por ejemplo VIH-1.

Por tanto, los antígenos pueden seleccionarse de antígenos derivados de VIH, particularmente antígenos derivados de VIH-1.

50 Las proteínas Tat y Nef de VIH son proteínas tempranas, es decir, se expresan pronto en la infección y en ausencia de proteína estructural.

El gen Nef codifica una proteína de VIH accesoria temprana que se ha mostrado que posee varias actividades. Por ejemplo, se sabe que la proteína Nef produce la retirada de CD4, el receptor de VIH, de la superficie celular, aunque se discute la importancia biológica de esta función. Adicionalmente, Nef interactúa con la ruta de señalización de

linfocitos T e induce un estado activo, que a su vez puede promover una expresión génica más eficaz. Algunos aislados de VIH tienen mutaciones o deleciones en esta región que producen que no codifiquen la proteína funcional y están gravemente comprometidos en su replicación y patogénesis *in vivo*.

5 El gen Gag se traduce a partir del ARN de longitud completa para dar una poliproteína precursora que posteriormente se escinde en 3 - 5 proteínas de la cápside; la proteína de la matriz p17, proteína de la cápside p24 y proteína de unión a ácido nucleico (Fundamental Virology, Fields BN, Knipe DM y Howley M, 1996 2. Fields Virology vol 2 1996).

10 El gen Gag da lugar a la proteína precursora Gag de 55 kilodalton (Kd), también llamada p55, que se expresa a partir del ARNm viral sin cortar y empalmar. Durante la traducción, el extremo N de p55 se miristoila, provocando su asociación con la cara citoplásmica de membranas celulares. La poliproteína Gag asociada a la membrana incorpora dos copias del ARN genómico viral junto con otras proteínas virales y celulares que provocan la gemación de la partícula viral a partir de la superficie de una célula infectada. Después de la gemación, la proteasa viralmente codificada (un producto del gen Pol) escinde p55 durante el procedimiento de maduración viral en cuatro proteínas más pequeñas designadas MA (matriz [p17]), CA (cápside [p24]), NC (nucleocápside [p9]) y p6.(4).

15 Además de las 3 proteínas Gag importantes (p17, p24 y p9), todos los precursores de Gag contienen varias regiones distintas que se escinden y permanecen en el virión como péptidos de diversos tamaños. Estas proteínas tienen funciones diferentes, por ejemplo, la proteína p2 tiene una función propuesta en la regulación de la actividad de la proteasa y contribuye a la correcta sincronización de la transformación proteolítica.

20 El polipéptido MA se deriva del extremo miristoilado N-terminal de p55. La mayoría de las moléculas de MA permanecen unidas a la superficie interna de la bicapa lipídica del virión, estabilizando la partícula. Un subconjunto de MA se incorpora dentro de las capas más profundas del virión, en las que llega a ser parte del complejo que conduce el ADN viral al núcleo. Estas moléculas de MA facilitan el transporte nuclear del genoma viral debido a que la maquinaria de importación nuclear celular reconoce una señal cariófila en MA. Este fenómeno permite que el VIH infecte células que no están en división, una propiedad poco común para un retrovirus.

25 La proteína p24 (CA) forma el núcleo cónico de partículas virales. Se ha demostrado que la ciclofilina A interactúa con la región p24 de p55, llevando a su incorporación en partículas de VIH. La interacción entre Gag y ciclofilina A es esencial debido a que la interrupción de esta interacción por ciclosporina inhibe la replicación viral.

30 La región NC de Gag es responsable de reconocer específicamente la denominada señal de encapsidación de VIH. La señal de encapsidación está constituida por cuatro estructuras en horquilla localizadas próximas al extremo 5' del ARN viral y es suficiente para intervenir en la incorporación de un ARN heterólogo en viriones de VIH-1. NC se une a la señal de encapsidación mediante interacciones mediadas por dos motivos de dedos de cinc. NC también facilita la transcripción inversa.

35 La región del polipéptido p6 interviene en las interacciones entre Gag p55 y la proteína accesoria Vpr, llevando a la incorporación de Vpr en viriones de ensamblaje. La región de p6 también contiene un denominado dominio tardío que se requiere para la liberación eficaz de viriones de gemación a partir de una célula infectada.

40 El gen Pol codifica tres proteínas que tienen las actividades que necesita el virus en la infección temprana, la proteína transcriptasa inversa RT, proteasa e integrasa necesarias para la integración del ADN viral en ADN celular. La proteasa del virión escinde el producto principal de Pol para dar el péptido de RT del extremo amino que contiene actividades necesarias para la síntesis de ADN (ADN polimerasa dirigida por ARN y ADN, ribonucleasa H) y proteína integrasa del extremo carboxi. La RT de VIH es un heterodímero de RT de longitud completa (p66) y un producto de escisión (p51) que carece del dominio de la RNasa H del extremo carboxi.

45 RT es una de las proteínas más sumamente conservadas codificada por el genoma retroviral. Dos actividades importantes de RT son Pol de ADN y ribonucleasa H. La actividad de Pol de ADN de RT usa ARN y ADN como moldes intercambiables y, como todas las polimerasas de ADN conocidas, no puede iniciar la síntesis de ADN de nuevo, sino que requiere una molécula preexistente que sirva como cebador (ARN).

La actividad de RNasa H inherente en todas las proteínas RT desempeña pronto el papel esencial en la replicación de eliminar el genoma de ARN a medida que progresa la síntesis de ADN. Degrada selectivamente el ARN de todas las moléculas híbridas de ARN - ADN. Estructuralmente, la polimerasa y ribo H ocupan dominios separados que no se solapan dentro de Pol, cubriendo los dos tercios del amino de Pol.

50 La subunidad catalítica p66 se pliega en 5 subdominios distintos. El extremo amino 23 de éstos tiene la parte con actividad de RT. El extremo carboxi a éstos es el dominio RNasa H.

55 Después de la infección de la célula huésped, la transcriptasa inversa que está presente en la partícula infectante copia el genoma de ARN retroviral en ADN bicatenario lineal. La integrasa (revisado en Skalka AM '99 Adv in Virus Res 52 271-273) reconoce los extremos del ADN viral, los recorta y acompaña al ADN viral a un sitio cromosómico huésped para catalizar la integración. Muchos sitios en el ADN huésped pueden ser dianas para la integración. Aunque la integrasa es suficiente para catalizar la integración *in vitro*, no es la única proteína asociada al ADN viral

in vivo – el gran complejo proteína - ADN viral aislado a partir de células infectadas se ha denominado el complejo de pre-integración. Éste facilita la adquisición de los genes de la célula huésped por genomas virales de la descendencia.

5 La integrasa está constituida por 3 dominios distintos, el dominio del extremo N, el núcleo catalítico y el dominio del extremo C. El dominio del núcleo catalítico contiene todos los requisitos para la química de transferencia de polinucleotídeos.

10 Por tanto, los antígenos derivados de VIH-1 pueden seleccionarse, por ejemplo, de Gag (por ejemplo Gag de longitud completa), p17 (una parte de Gag), p24 (otra parte de Gag), p41, p40, Pol (por ejemplo Pol de longitud completa), RT (una parte de Pol), p51 (una parte de RT), integrasa (una parte de Pol), proteasa (una parte de Pol), Env, gp120, gp140 o gp160, gp41, Nef, Vif, Vpr, Vpu, Rev, Tat y derivados inmunógenos de los mismos y fragmentos inmunógenos de los mismos y fragmentos inmunógenos de los mismos que incluyen p17, p24, RT e integrasa. Las vacunas contra el VIH pueden comprender polipéptidos y/o polinucleótidos que codifican polipéptidos correspondientes a múltiples antígenos de VIH diferentes, por ejemplo 2 o 3 o 4 o más antígenos de VIH que pueden seleccionarse de la lista anterior. Varios antígenos diferentes pueden estar comprendidos, por ejemplo, en una única proteína de fusión. Puede emplearse más de un primer polipéptido inmunógeno y/o más de un segundo polipéptido inmunógeno, siendo cada uno un antígeno de VIH o una fusión de más de un antígeno.

15 Por ejemplo, un antígeno puede comprender Gag o un derivado inmunógeno o fragmento inmunógeno del mismo, fusionado a RT o un derivado inmunógeno o fragmento inmunógeno de la misma, fusionado a Nef o un derivado inmunógeno o fragmento inmunógeno de la misma, en el que la parte de Gag de la proteína de fusión está presente en el extremo 5' del polipéptido.

Una secuencia de Gag puede excluir la secuencia que codifica el polipéptido p6 de Gag. Un ejemplo particular de una secuencia de Gag comprende secuencias que codifican p17 y/o p24.

20 Una secuencia de RT puede contener una mutación para inactivar sustancialmente cualquier actividad de la transcriptasa inversa (véase el documento WO03/025003).

25 El gen de RT es un componente del mayor gen *pol* en el genoma de VIH. Se entenderá que la secuencia de RT empleada según la presente divulgación puede estar presente en el contexto de Pol, o un fragmento de Pol que se corresponde al menos con RT. Tales fragmentos de Pol retienen epítomos CTL muy importantes de Pol. En un ejemplo específico, RT está incluida como precisamente el fragmento de p51 o precisamente el fragmento de p66 de RT.

El componente de RT de la proteína de fusión o composición comprende opcionalmente una mutación para eliminar un sitio que sirve como sitio interno de iniciación en sistemas de expresión procariota.

30 Opcionalmente, la secuencia de Nef se trunca para eliminar la secuencia que codifica la región del extremo N, es decir, la eliminación de 30 a 85 aminoácidos, por ejemplo de 60 a 85 aminoácidos, particularmente los 65 aminoácidos del extremo N (este último truncamiento se denomina en el presente documento Neftr). Alternativamente o adicionalmente, Nef puede modificarse para eliminar el sitio de miristilación. Por ejemplo, el sitio de miristilación de Gly 2 puede eliminarse mediante delección o sustitución. Alternativamente o adicionalmente, Nef puede modificarse para alterar el motivo de dileucina de Leu 174 y Leu 175 mediante delección o sustitución de una o ambas leucinas. La importancia del motivo de dileucina en la regulación por disminución de CD4 se describe, por ejemplo, en Bresnahan P.A. y col. (1998) *Current Biology*, 8(22): 1235-8.

35 El antígeno de Env puede estar presente en su longitud completa como gp160 o truncado como gp140 o más corto (opcionalmente con una mutación adecuada para destruir el motivo del sitio de escisión entre gp120 y gp41). El antígeno de Env también puede estar presente en su forma transformada de procedencia natural como gp120 y gp41. Estos dos derivados de gp160 pueden usarse individualmente o juntos como una combinación. Los antígenos de Env anteriormente mencionados pueden presentar adicionalmente delecciones (en particular de bucles variables) y truncamientos. También pueden usarse fragmentos de Env.

Una secuencia de gp120 a modo de ejemplo se muestra en SEQ ID No 8. Una secuencia de gp140 a modo de ejemplo se muestra en SEQ ID No 6.

40 Los polipéptidos inmunógenos según la divulgación puede comprender Gag, Pol, Env y Nef, en los que al menos están presentes el 75 %, o al menos el 90 % o al menos el 95 %, por ejemplo el 96 %, de los epítomos CTL de estos antígenos nativos.

En polipéptidos inmunógenos según la divulgación que comprenden p17/p24 Gag, p66 RT y Nef truncado como se define anteriormente, el 96 % de los epítomos CTL de los antígenos nativos de Gag, Pol y Nef está presente adecuadamente.

55 Un ejemplo proporciona un polipéptido inmunógeno que contiene p17, p24 Gag, p66 RT, Nef truncado (carece de

nucleótidos que codifican los aminoácidos terminales 1-85 - "Neftr") en el orden Gag, RT, Nef. En los polinucleótidos que codifican polipéptidos inmunógenos, P24 Gag y P66 RT son adecuadamente de codón optimizado.

Construcciones específicas de polinucleótidos y antígenos de polipéptidos correspondientes según la presente divulgación incluyen:

- 5 1. p17, p24 (de codón optimizado) Gag - p66 RT (de codón optimizado) - Nef truncado;
2. Nef truncado - p66 RT (de codón optimizado) - p17, p24 (de codón optimizado) Gag;
3. Nef truncado - p17, p24 (de codón optimizado) Gag - p66 RT (de codón optimizado);
4. p66 RT (de codón optimizado) - p17, p24 (de codón optimizado) Gag - Nef truncado;
- 10 5. p66 RT (de codón optimizado) - Nef truncado - p17, p24 (de codón optimizado) Gag;
6. p17, p24 (de codón optimizado) Gag - Nef truncado - p66 RT (de codón optimizado).

Una fusión a modo de ejemplo es una fusión de Gag, RT y Nef particularmente en el orden Gag-RT-Nef (véase, por ejemplo, SEQ ID No 2). Otra fusión a modo de ejemplo es una fusión de p17, p24, RT y Nef particularmente en el orden p24-RT-Nef-p17 (véase, por ejemplo, SEQ ID No 16, mencionada en otras partes en el presente documento como "F4").

- 15 En un ejemplo, un polipéptido inmunógeno contiene Gag, RT, integrasa y Nef, especialmente en el orden Gag-RT-integrasa-Nef (véase, por ejemplo, SEQ ID No 4).

En otros ejemplos, el antígeno de VIH puede ser un polipéptido de fusión que comprende Nef o un derivado inmunógeno del mismo o un fragmento inmunógeno del mismo, y p17 Gag y/o p24 Gag o derivados inmunógenos de los mismos o fragmentos inmunógenos de los mismos en los que, cuando tanto p17 Gag como p24 Gag están presentes, entre ellos hay al menos un antígeno de VIH o fragmento inmunógeno.

Por ejemplo, Nef es adecuadamente Nef de longitud completa.

Por ejemplo, p17 Gag y p24 Gag son adecuadamente p17 y p24 de longitud completa, respectivamente.

- 25 En un ejemplo, un polipéptido inmunógeno comprende tanto p17 Gag como p24 Gag o fragmentos inmunógenos de los mismos. En una construcción tal, el componente de p24 Gag y el componente de p17 Gag están separados por al menos otro antígeno de VIH adicional o fragmento inmunógeno tal como Nef y/o RT o derivados inmunógenos de los mismos o fragmentos inmunógenos de los mismos. Para más detalles véase el documento WO2006/013106.

En proteínas de fusión que comprenden p24 y RT puede preferirse que p24 preceda a RT en la construcción porque se observa mejor expresión de p24 que de RT cuando los antígenos se expresan solos en *E. coli*.

Algunas construcciones ejemplares según la divulgación incluyen las siguientes:

- 30 1. p24 - RT - Nef - p17
2. p24 - RT* - Nef - p17
3. p24 - p51RT - Nef - p17
4. p24 - p51RT* - Nef - p17
- 35 5. p17 - p51RT - Nef
6. p17 - p51RT* - Nef
7. Nef - p17
8. Nef - p17 con conector
9. p17 - Nef
- 40 10. p17 - Nef con conector
- * representa la mutación de metionina₅₉₂ de RT a lisina

- 45 También se desvela una proteína de fusión de antígenos de VIH que comprende al menos cuatro antígenos de VIH o fragmentos inmunógenos, en la que los cuatro antígenos o fragmentos son o se derivan de Nef, Pol y Gag. Preferentemente, Gag está presente como dos componentes separados que están separados por al menos otro antígeno en la fusión. Preferentemente, Nef es Nef de longitud completa. Preferentemente, Pol es p66 o p51RT. Preferentemente, Gag es p17 Gag y p24 Gag. Otros rasgos y propiedades preferidos de los componentes de antígeno de la fusión son como se describen en el presente documento.

Ejemplos preferidos de este aspecto de la divulgación son las fusiones de cuatro componentes que ya se enumeran anteriormente:

- 50 1. p24 - RT - Nef - p17
2. p24 - RT* - Nef - p17
3. p24 - p51RT - Nef - p17
4. p24 - p51RT* - Nef - p17

Los polipéptidos inmunógenos de la presente divulgación pueden tener secuencias de conectores presentes entre las secuencias correspondientes a antígenos particulares tales como Gag, RT y Nef. Tales secuencias de

conectores pueden ser, por ejemplo, de hasta 20 aminoácidos de longitud. En un ejemplo particular pueden ser de 1 a 10 aminoácidos, o de 1 a 6 aminoácidos, por ejemplo 4-6 aminoácidos.

La descripción adicional de tales antígenos de VIH adecuados puede encontrarse en el documento WO03/025003.

5 Los antígenos de VIH de la presente divulgación pueden derivarse de cualquier subtipo de VIH, por ejemplo subtipo A, subtipo B o subtipo C. Por ejemplo, los antígenos de VIH pueden derivarse del subtipo A o B, especialmente B.

En un ejemplo específico de la invención, un primer polipéptido inmunógeno es un polipéptido que comprende Gag y/o Pol y/o Nef o un fragmento o derivado de cualquiera de ellos (por ejemplo p24-RT-Nef-p17). En un ejemplo específico, un segundo polipéptido inmunógeno es un polipéptido que comprende Gap y/o Pol y/o Nef o un fragmento o derivado de cualquiera de ellos (por ejemplo Gag-RT-Nef o Gag-RT-integrasa-Nef).

10 Por tanto, en un ejemplo específico, un polipéptido que comprende Gap y/o Pol y/o Nef o un fragmento o derivado de cualquiera de ellos (por ejemplo p24-RT-Nef-p17) es un primer polipéptido inmunógeno y un polipéptido que comprende Gap y/o Pol y/o Nef o un fragmento o derivado de cualquiera de ellos (por ejemplo Gag-RT-Nef o Gag-RT-integrasa-Nef) es un segundo polipéptido inmunógeno.

15 En otro ejemplo específico, un primer polipéptido inmunógeno es Env o un fragmento o derivado del mismo, por ejemplo gp120, gp140 o gp160 (especialmente gp120). En un ejemplo específico, un segundo polipéptido inmunógeno es un polipéptido que comprende Gag y/o Pol y/o Nef o un fragmento o derivado de cualquiera de ellos (por ejemplo p24-RT-Nef-p17).

20 Por tanto, en un ejemplo específico, Env o un fragmento o derivado del mismo, por ejemplo gp120, gp140 o gp160 (especialmente gp120), es un primer polipéptido inmunógeno y un polipéptido que comprende Gag y/o Pol y/o Nef o un fragmento o derivado de cualquiera de ellos (por ejemplo p24-RT-Nef-p17) es un segundo polipéptido inmunógeno.

25 En otro ejemplo específico, un primer polipéptido inmunógeno es un polipéptido que comprende Gag y/o Pol y/o Nef o un fragmento o derivado de cualquiera de ellos (por ejemplo p24-RT-Nef-p17). En un ejemplo específico, un segundo polipéptido inmunógeno es Env o un fragmento o derivado del mismo, por ejemplo gp120, gp140 o gp160 (especialmente gp120).

Por tanto, en un ejemplo específico, un polipéptido que comprende Gag y/o Pol y/o Nef o un fragmento o derivado de cualquiera de ellos (por ejemplo p24-RT-Nef-p17) es un primer polipéptido inmunógeno y Env o un fragmento o derivado del mismo, por ejemplo gp120, gp140 o gp160 (especialmente gp120), es un segundo polipéptido inmunógeno.

30 **Derivados inmunógenos y fragmentos inmunógenos de antígenos**

Los antígenos anteriormente mencionados pueden emplearse en forma de derivados inmunógenos o fragmentos inmunógenos de los mismos en vez del antígeno completo.

35 Como se usa en el presente documento, el término "derivado inmunógeno" en relación con un antígeno de origen nativo se refiere a un antígeno que se ha modificado en un modo limitado respecto a sus homólogos nativos. Por ejemplo, puede incluir una mutación puntual que puede cambiar las propiedades de la proteína mejorando, por ejemplo, la expresión en sistemas procariotas o eliminando actividad no deseada, por ejemplo actividad enzimática. Sin embargo, los derivados inmunógenos serán suficientemente similares a los antígenos nativos de forma que retengan sus propiedades antigénicas y sigan siendo capaces de fomentar una respuesta inmunitaria frente al antígeno nativo. El hecho de que un derivado dado fomente dicha respuesta inmunitaria o no puede medirse mediante un ensayo adecuadamente inmunológico tal como un ELISA (para respuestas de anticuerpos) o citometría de flujo usando tinción adecuada para marcadores celulares (para respuestas celulares).

40 Los fragmentos inmunógenos son fragmentos que codifican al menos un epítipo, por ejemplo un epítipo CTL, normalmente un péptido de al menos 8 aminoácidos. Los fragmentos de al menos 8, por ejemplo, 8-10 aminoácidos o hasta 20, 50, 60, 70, 100, 150 o 200 aminoácidos de longitud se consideran que están dentro del alcance de la divulgación siempre que el polipéptido demuestre antigenicidad, es decir, que el polipéptido retenga los epítipos importantes (por ejemplo epítipos CTL).

Adenovirus

Los vectores adenovirales de la presente invención comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos (ADN) que codifican uno o más polipéptidos inmunógenos.

50 Vectores adenovirales útiles en la presente invención pueden derivarse de una serie de huéspedes mamíferos.

Los adenovirus (en el presente documento se denominan "Ad" o "Adv") tienen una morfología característica con una cápside icosaédrica constituida por tres proteínas muy importantes, hexona (II), base de pentona (III) y una fibra abultada (IV), junto con varias otras proteínas secundarias, VI, VIII, IX, IIIa y IVa2 (Russell W.C. 2000, Gen Viriol,

- 81:2573-2604). El genoma del virus es un ADN bicatenario lineal con una proteína terminal unida covalentemente al extremo 5', que tiene repeticiones terminales invertidas (ITR). El ADN del virus está íntimamente asociado a la proteína VII sumamente básica y un péptido pequeño llamado mu. Otra proteína, V, está encapsidada con este complejo ADN-proteína y proporciona un enlace estructural a la cápside mediante la proteína VI. El virus también contiene una proteasa codificada por virus que es necesaria para transformar algunas de las proteínas estructurales para producir virus infecciosos maduros.
- Se han aislado más de 100 serotipos distintos de adenovirus que infectan diversas especies de mamíferos, de los que 51 son de origen humano. Por tanto, uno o más de los vectores adenovirales pueden derivarse de un adenovirus humano. Ejemplos de tales adenovirus derivados de humanos son Ad1, Ad2, Ad4, Ad5, Ad6, Ad11, Ad24, Ad34, Ad35, particularmente Ad5, Ad11 y Ad35. Los serotipos humanos se han clasificado en seis subgéneros (A-F) basados en varios criterios biológicos, químicos, inmunológicos y estructurales.
- Aunque los vectores basados en Ad5 se han usado ampliamente en varios ensayos de terapia génica, puede haber limitaciones en el uso de Ad5 y otros vectores adenovirales del grupo C debido a la inmunidad preexistente en la población general debido a la infección natural. Ad5 y otros miembros del grupo C tienden a estar entre los serotipos más seroprevalentes. La inmunidad a vectores existentes puede desarrollarse como resultado de exposición al vector durante el tratamiento. Estos tipos de inmunidad preexistente o desarrollada a vectores seroprevalentes pueden limitar la eficacia de la terapia génica o esfuerzos de vacunación. Por tanto, los serotipos de adenovirus alternativos constituyen dianas muy importantes en la persecución de sistemas de liberación génica que puedan eludir la respuesta inmunitaria del huésped.
- Un área tal de serotipos alternativos son aquellos derivados de primates no humanos, especialmente adenovirus de chimpancé. Véase la patente de los EE.UU. 6.083.716 que describe el genoma de dos adenovirus de chimpancé.
- Se ha mostrado que los vectores adenovirales de chimpancé ("Pan" o "C") inducen fuertes respuestas inmunitarias a productos transgénicos tan eficazmente como vectores adenovirales humanos (Fitzgerald y col. J. Immunol. 170:1416).
- Los adenovirus de primates no humanos pueden aislarse de los ganglios linfáticos mesentéricos de chimpancés. Los adenovirus de chimpancé son suficientemente similares al subtipo C de adenovirus humanos para permitir la replicación del virus con E1 eliminado en células HEK 293. Aunque los adenovirus de chimpancé son filogenéticamente distintos de los serotipos humanos más comunes (Ad2 y Ad5). Pan 6 no está tan estrechamente relacionado y es serológicamente distinto de Pan 5, 7 y 9.
- Por tanto, uno o más de los vectores adenovirales puede derivarse de un adenovirus de primate no humano, por ejemplo un adenovirus de chimpancé, tal como uno seleccionado de los serotipos Pan5, Pan6, Pan7 y Pan9.
- Los vectores adenovirales también pueden derivarse de más de un serotipo de adenovirus, y cada serotipo puede proceder de la misma fuente o fuente diferente. Por ejemplo, pueden derivarse de más de un serotipo humano y/o más de un serotipo de primate no humano. Los procedimientos para construir vectores adenovirales quiméricos se describen en el documento WO2005/001103.
- Hay ciertas restricciones de tamaño asociadas a la inserción de ADN heterólogo en adenovirus. Los adenovirus humanos tienen la capacidad de encapsidar hasta el 105 % de la longitud del genoma de tipo salvaje (Bett y col. 1993, J Virol 67 (10), 5911-21). Se ha mostrado que el límite inferior de encapsidación para adenovirus humanos es del 75 % de la longitud del genoma de tipo salvaje (Parks y col. 1995, J Virol 71(4), 3293-8).
- Un ejemplo de adenovirus útiles en la presente invención son adenovirus que son distintos de los serotipos de procedencia natural prevalentes en la población humana tales como Ad2 y Ad5. Esto evita la inducción de potentes respuestas inmunitarias frente al vector que limita la eficacia de administraciones posteriores del mismo serotipo bloqueándose la captación de vectores mediante neutralización del anticuerpo e influenciando en la toxicidad.
- Por tanto, el adenovirus puede ser un adenovirus que no sea un serotipo de virus humano de procedencia natural prevalente. Los adenovirus aislados de animales tienen componentes de cápside, hexona, pentona y fibra inmunológicamente distintos, pero filogenéticamente están estrechamente relacionados. Específicamente, el virus puede ser un adenovirus no humano, tal como un adenovirus de simio y en particular un adenovirus de chimpancé tal como Pan 5, 6, 7 o 9. Ejemplos de tales cepas se describen en el documento WO03/000283 y están disponibles de la Colección americana de cultivos tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, y otras fuentes. Las cepas deseables de adenovirus de chimpancé son Pan 5 [ATCC VR-591], Pan 6 [ATCC VR-592] y Pan 7 [ATCC VR-593].
- Se cree que el uso de adenovirus de chimpancé es ventajoso respecto al uso de serotipos de adenovirus humano debido a la falta de inmunidad preexistente, en particular a la falta de anticuerpos de neutralización cruzada, a adenovirus en la población diana. La reacción cruzada de los adenovirus de chimpancé con respuestas de anticuerpos neutralizadores preexistentes solo está presente en el 2 % de la población diana en comparación con el 35 % en el caso de ciertos vectores candidatos de adenovirus humano. Los adenovirus de chimpancé son distintos de los subtipos humanos más comunes Ad2 y Ad5, pero están más estrechamente relacionados con Ad4 humano

del subgrupo E, que no es un subtipo prevalente. Pan 6 está menos estrechamente relacionado con Pan 5, 7 y 9.

El adenovirus de la invención puede tener replicación defectuosa. Esto significa que tiene una capacidad reducida para replicarse en células no complementarias en comparación con el virus de tipo salvaje. Esto puede provocarse mutando el virus, por ejemplo eliminando un gen implicado en la replicación, por ejemplo delección del gen de E1a, E1b, E3 o E4.

Los vectores adenovirales según la presente invención pueden derivarse de adenovirus de replicación defectuosa que comprenden una delección de E1 funcional. Por tanto, los vectores adenovirales según la invención pueden tener replicación defectuosa debido a la ausencia de la capacidad para expresar E1a y E1b adenoviral, es decir, están funcionalmente eliminados en E1a y E1b. Los adenovirus recombinantes también pueden llevar delecciones funcionales en otros genes [véase el documento WO03/000283], por ejemplo, delecciones en genes de E3 o E4. El gen E3 temprano retrasado del adenovirus puede eliminarse de la secuencia de adenovirus que forma parte del virus recombinante. La función de E3 no es necesaria la producción de la partícula de adenovirus recombinante. Por tanto, es innecesario reemplazar la función de este producto génico con el fin de encapsidar un adenovirus recombinante útil en la invención. En una realización particular, los adenovirus recombinantes tienen los genes de E1 y E3 funcionalmente eliminados. La construcción de tales vectores se describe en Roy y col., Human Gene Therapy 15:519-530, 2004.

Los adenovirus recombinantes también pueden construirse teniendo una delección funcional del gen de E4, aunque puede desearse que retengan la función ORF6 de E4. Los vectores de adenovirus según la invención también pueden contener una delección en el gen E2a temprano retrasado. Las delecciones también pueden hacerse en cualquiera de los genes tardíos L1 a L5 del genoma del adenovirus. Similarmente, pueden ser útiles delecciones en los genes intermedios IX y IVa.

Pueden hacerse otras delecciones en los otros genes de adenovirus estructurales o no estructurales. Las delecciones anteriores pueden usarse individualmente, es decir, una secuencia de adenovirus para uso en la presente invención puede contener delecciones de E1 solamente. Alternativamente, las delecciones de genes completos o partes de los mismos eficaces para destruir su actividad biológica pueden usarse en cualquier combinación. Por ejemplo, en un vector a modo de ejemplo, las secuencias de adenovirus pueden tener delecciones de los genes de E1 y el gen de E4, o de los genes de E1, E2a y E3, o de los genes de E1 y E3 (tales como delecciones funcionales en E1a y E1b, y una delección de al menos parte de E3), o de los genes de E1, E2a y E4, con o sin delección de E3, etc. Tales delecciones pueden ser delecciones parciales o completas de estos genes y pueden usarse en combinación con otras mutaciones, tales como mutaciones sensibles a la temperatura, para lograr un resultado deseado.

Los vectores adenovirales pueden producirse en cualquier línea celular adecuada en la que pueda replicarse el virus. En particular pueden usarse líneas celulares complementarias que proporcionan los factores que faltan del vector viral que dan como resultado sus características de replicación alteradas (tales como E1 y/o E4). Sin limitación, una línea celular tal puede ser HeLa [N.º de acceso a ATCC CCL 2], A549 [N.º de acceso a ATCC CCL 185], HEK 293, KB [CCL 17], Detroit [por ejemplo, Detroit 510, CCL 72] y células WI-38 [CCL 75], entre otros. Todas estas líneas celulares están disponibles de la Colección americana de cultivos tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209. Otras líneas celulares originales adecuadas pueden obtenerse de otras fuentes tales como células PER.C6©, como se representa por las células depositadas bajo el N.º de ECACC N.º 96022940 en la Colección europea de cultivos celulares animales (ECACC) en el Centro de Microbiología Aplicada e Investigación (CAMR, RU) o células Her 96 (CruCell).

Las secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos inmunógenos pueden ser de codón optimizado para células de mamíferos. Tal optimización de codones se describe en detalle en el documento WO05/025614. La optimización de codones para ciertas secuencias de VIH se describe adicionalmente en el documento WO03/025003.

En una realización de la presente invención, las construcciones de polinucleótidos comprenden una secuencia conductora en el extremo N. La secuencia de señalización, el dominio transmembranario y el dominio citoplásmico están todos individualmente opcionalmente presentes o eliminados. En una realización de la presente invención todas estas regiones están presentes, pero modificadas.

Un promotor para uso en el vector adenoviral según la invención puede ser el promotor del gen IE de HCMV, por ejemplo, en el que la región sin traducir de 5' del gen IE de HCMV que comprende el exón 1 está incluida y el intrón A se excluye completamente o parcialmente como se describe en el documento WO02/36792.

Si se fusionan varios antígenos en una proteína de fusión, tal proteína estaría codificada por un polinucleótido bajo el control de un único promotor.

En una realización alternativa de la invención, varios antígenos pueden expresarse por separado mediante promotores individuales, pudiendo ser cada uno de dichos promotores iguales o diferentes. En todavía otra realización de la invención, algunos de los antígenos pueden formar una fusión, ligada a un primer promotor, y otro(s) antígeno (s) pueden ligarse a un segundo promotor, que puede ser igual o diferente del primer promotor.

Por tanto, el vector adenoviral puede comprender uno o más casetes de expresión, codificando cada uno un antígeno bajo el control de un promotor. Alternativamente o adicionalmente puede comprender uno o más casetes de expresión, codificando cada uno más de un antígeno bajo el control de un promotor, cuyos antígenos se expresan así como una fusión. Cada casete de expresión puede estar presente en más de un locus en el vector adenoviral.

El polinucleótido o polinucleótidos que codifican polipéptidos inmunógenos que van a expresarse pueden insertarse en cualquiera de las regiones eliminadas del adenovirus, por ejemplo en la región de eliminación de E1.

Aunque dos o más polinucleótidos que codifican polipéptidos inmunógenos pueden ligarse como una fusión, la proteína resultante puede expresarse como una proteína de fusión, o puede expresarse como productos de proteínas separados, o puede expresarse como una proteína de fusión y luego descomponerse posteriormente en subunidades más pequeñas.

Adyuvante

Los adyuvantes se describen en general en Vaccine Design - the Subunit and Adjuvant Approach, por ejemplo, Powell y Newman, Plenum Press, Nueva York, 1995.

Adyuvantes pueden incluir una sal de aluminio tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, pero también puede ser una sal de calcio, hierro o cinc, o puede ser una suspensión insoluble de tirosina acilada, o azúcares acilados, polisacáridos catiónica o aniónicamente derivatizados o polifosfacenos.

En la formulación de la invención se prefiere que la composición adyuvante induzca preferentemente una respuesta de Th1. Sin embargo, se entenderá que no se excluyen otras respuestas, incluyendo otras respuestas humorales.

Se sabe que ciertos adyuvantes de vacunas son particularmente aptos para la estimulación de respuestas de citocinas tanto del tipo Th1 como Th2. Tradicionalmente, los mejores indicadores del equilibrio Th1:Th2 de la respuesta inmunitaria después de una vacunación o infección incluyen la medición directa de la producción de citocinas Th1 o Th2 por linfocitos T *in vitro* después de la reestimulación con antígeno, y/o la medición de la relación IgG1:IgG2a de respuestas de anticuerpos específicos para antígenos.

Por tanto, un adyuvante del tipo Th1 es uno que estimula poblaciones de linfocitos T aisladas para producir altos niveles de citocinas del tipo Th1 *in vivo* (como se mide en el suero) o *ex vivo* (citocinas que se miden cuando las células se vuelven a estimular con antígeno *in vitro*) e induce respuestas de inmunoglobulinas específicas para antígenos asociadas al isotipo del tipo Th1.

Inmunoestimulantes del tipo Th1 preferidos que pueden formularse para producir adyuvantes adecuados para uso en la presente invención incluyen los siguientes:

Los ligandos del receptor similar a Toll (TLR)4, especialmente un agonista tal como un derivado de lípido A, particularmente monofosforil lípido A o más particularmente monofosforil lípido A 3-desacilado (3D-MPL).

3D-MPL se comercializa bajo la marca registrada MPL® por GlaxoSmithKline y promueve principalmente las respuestas de linfocitos T CD4+ caracterizadas por la producción de IFN-g (células Th1, es decir, linfocitos T colaboradores CD4 con un fenotipo del tipo 1). Puede producirse según los procedimientos descritos en el documento GB 2 220 211 A. Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Preferentemente, en las composiciones de la presente invención se usa 3D-MPL de partículas pequeñas. 3D-MPL de partículas pequeñas tiene un tamaño de partícula de forma que puede filtrarse estéril a través de un filtro de 0,22 µm. Tales preparaciones se describen en la solicitud de patente internacional N.º WO94/21292.

Los derivados sintéticos del lípido A son conocidos y se cree que son agonistas de TLR4 que incluyen, pero no se limitan a:

OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetra-decanoilamino]-4-o-fosfono-β-D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]- α-D-glucopiranosildihidrogenofosfato), (documento WO95/14026)

OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decano-1,10-diol,1,10-bis(dihidrogenofosfato) (documentos WO99/64301 y WO00/0462)

OM 197 MP-Ac DP 10-(6-aminohexanoato) de (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decano-1,10-diol,1-dihidrogenofosfato (documento WO01/46127)

Otros ligandos de TLR4 son fosfatos de alquilglucosaminida (AGP) tales como aquellos descritos en los documentos WO9850399 o US6303347 (también se describen procedimientos para la preparación de AGP) o sales farmacéuticamente aceptables de AGP como se describen en el documento US6764840. Algunos AGP son agonistas de TLR4, y algunos son antagonistas de TLR4. Se cree que ambos son útiles como adyuvantes.

Las saponinas también son inmunoestimulantes de Th1 preferidos según la invención. Las saponinas son adyuvantes muy conocidos y se enseñan en: Lacaille-Dubois, M y Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine vol 2, pág. 363-386). Por ejemplo, Quil A (derivado de la

5 corteza del árbol sudamericano Quillaja Saponaria Molina) y fracciones del mismo, se describen en el documento US5.057.540 y "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2): 1-55; y el documento EP0362279B1. Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones de Quil A purificadas por HPLC) se han descrito como potentes adyuvantes sistémicos y el procedimiento de su producción se describe en la patente de los EE.UU. N.º 5.057.540 y el documento EP0362279B1. En estas referencias también se describe el uso de QS7 (una fracción no hemolítica de Quil A) que actúa como un potente adyuvante para vacunas sistémicas. El uso de QS21 se describe adicionalmente en Kensil y col. (1991. J. Immunology vol 146, 431-437). También se conocen combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina (documento WO99/10008). Los sistemas de adyuvantes en partículas que comprenden fracciones de QuilA, tales como QS21 y QS7, se describen en los documentos WO96/33739 y WO96/11711. Un sistema tal se conoce como un ISCOM y puede contener una o más saponinas.

El adyuvante de la presente invención puede comprender en particular un ligando del receptor similar a Toll (TLR)4, especialmente 3D-MPL, en combinación con un derivado de saponina, especialmente QS21.

15 En otros ejemplos, los adyuvantes incluyen ligandos TLR 9 (agonistas). Por tanto, otro inmunoadyuvante preferido es un oligonucleótido inmunoadyuvante que contiene dinucleótidos CpG sin metilar ("CpG"). CpG es una abreviatura de motivos dinucleótido citosina-guanosina presentes en el ADN. CpG se conoce en la técnica como un adyuvante cuando se administra por vías tanto sistémicas como mucosas (documentos WO96/02555, EP468520, Davis y col., J. Immunol, 1998, 160(2):870-876; McCluskie y Davis, J. Immunol., 1998, 161(9):4463-6). Históricamente se observó que la fracción de ADN de BCG podría ejercer un efecto antitumoral. En otros estudios, los oligonucleótidos sintéticos derivados de secuencias de genes de BCG mostraron que podían inducir efectos inmunoadyuvantes (tanto *in vitro* como *in vivo*). Los autores de estos estudios concluyeron que ciertas secuencias palindrómicas, incluyendo un motivo CG central, llevaban esta actividad. El papel principal del motivo CG en la inmunoadyuvación se aclaró más tarde en una publicación de Krieg, Nature 374, p. 546 1995. El análisis detallado ha mostrado que el motivo CG tiene que estar en un cierto contexto de secuencias y que tales secuencias son comunes en ADN bacteriano, pero son raras en ADN de vertebrado. La secuencia inmunoadyuvante es frecuentemente: purina, purina, C, G, pirimidina, pirimidina; en la que el motivo CG no está metilado, pero se sabe que otras secuencias de CpG sin metilar son inmunoadyuvantes y pueden usarse en la presente divulgación.

20 En ciertas combinaciones de los seis nucleótidos se presenta una secuencia palindrómica. En el mismo oligonucleótido pueden estar presentes varios de estos motivos, como repeticiones de un motivo o una combinación de diferentes motivos. La presencia de una o más de estas secuencias inmunoadyuvantes que contienen oligonucleótidos puede activar diversos subconjuntos inmunológicos, incluyendo células asesinas naturales (que producen interferón γ y tienen actividad citolítica) y macrófagos (Wooldrige y col. vol 89 (N.º 8), 1977). Ahora también se ha mostrado que otras secuencias que contienen CpG sin metilar que no tienen esta secuencia consenso son inmunomoduladoras.

30 CpG, cuando se formula en vacunas, se administra generalmente en disolución libre junto con antígeno libre (documento WO96/02555; McCluskie y Davis, como arriba) o covalentemente conjugado a un antígeno (documento WO98/16247) o se formula con un soporte tal como hidróxido de aluminio ((antígeno superficial de la hepatitis) Davis y col. como arriba; Brazolot-Millan y col., Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 1998, 95(26), 15553-8).

40 En otros ejemplos, otros agonistas de TLR9 de interés potencial incluyen oligonucleótidos que contienen el motivo CpR inmunoadyuvante y oligonucleótidos que contienen el motivo YpG (Idera).

Tales inmunoadyuvantes como se describen anteriormente pueden formularse junto con soportes, tales como por ejemplo liposomas, emulsiones aceite en agua y o sales metálicas que incluyen sales de aluminio (tales como hidróxido de aluminio). Por ejemplo, 3D-MPL puede formularse con hidróxido de aluminio (documento EP0689454) o emulsiones aceite en agua (documento WO95/17210); QS21 puede formularse ventajosamente con liposomas que contienen colesterol (documento WO96/33739), emulsiones aceite en agua (documento WO95/17210) o alumbre (documento WO98/15287); CpG puede formularse con alumbre (Davis y col. como antes; Brazolot-Millan como antes) o con otros soportes catiónicos.

50 También se prefieren combinaciones de inmunoadyuvantes, en particular una combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina (documentos WO94/00153; WO95/17210; WO96/33739; WO98/56414; WO99/12565; WO99/11241), más particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se describe en el documento WO94/00153. Como alternativa, una combinación de CpG más una saponina tal como QS21 también forma un potente adyuvante para uso en la presente divulgación. Alternativamente, la saponina puede formularse en un liposoma o en un ISCOM y combinarse con un oligonucleótido inmunoadyuvante.

55 Por tanto, sistemas de adyuvantes incluyen, por ejemplo, una combinación de monofosforil lípido A, preferentemente 3D-MPL, junto con una sal de aluminio (por ejemplo como se describe en el documento WO00/23105).

Un sistema mejorado implica la combinación de un monofosforil lípido A y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL como se describe en el documento WO94/00153, o una composición menos reactogénica en la que QS21 se inactiva en liposomas que contienen colesterol (DQ) como se describe en el

documento WO96/33739. Esta combinación puede comprender adicionalmente un oligonucleótido inmunoestimulante.

Por tanto, un ejemplo de adyuvante comprende QS21 y MPL.

5 Una formulación de adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión aceite en agua se describe en el documento WO95/17210 y es otra formulación preferida para uso en la invención.

Otra formulación preferida comprende un oligonucleótido CpG solo o junto con una sal de aluminio.

En otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un procedimiento de preparación de una formulación de vacuna como se describe en el presente documento, en el que el procedimiento comprende mezclar uno o más primeros polipéptidos inmunógenos según la invención con un adyuvante adecuado.

10 Adyuvantes particularmente preferidos para uso en las formulaciones según la invención son los siguientes:

- i) 3D-MPL + QS21 en un liposoma (véase, por ejemplo, el adyuvante B más adelante)
- ii) Alumbre + QS21 en un liposoma + 3D-MPL
- iii) 3D-MPL + QS21 + emulsión aceite en agua
- iv) 3D-MPL + QS21 (por ejemplo en un liposoma) + CpG

15 Los adyuvantes particularmente preferidos para su uso en las formulaciones según la divulgación son los siguientes:

- v) Alumbre + 3D-MPL
- vi) Alumbre + CpG
- vii) CpG
- viii) QS21+CpG.

20 Preferentemente, el adyuvante se presenta en forma de un liposoma, ISCOM o una emulsión aceite en agua. En un ejemplo de realización de la invención, el adyuvante comprende una emulsión aceite en agua. En otro ejemplo de realización de la invención, el adyuvante comprende liposomas.

25 Adecuadamente, el componente adyuvante no contiene ningún virus. Por tanto, adecuadamente, las composiciones para uso según la invención no contienen ningún virus distinto del uno o más vectores adenovirales que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más segundos polipéptidos inmunógenos derivados de un patógeno.

Composiciones, dosificación y administración

En los procedimientos de la divulgación, el (los) polipéptido(s) inmunógeno(s), el (los) vector(es) adenoviral(es) y el adyuvante se administran simultáneamente.

30 Normalmente, el adyuvante se formulará conjuntamente con un polipéptido inmunógeno. Adecuadamente, el adyuvante también se formulará conjuntamente con cualquier otro polipéptido inmunógeno que va a administrarse.

35 Un procedimiento de fomento de una respuesta inmunitaria comprende administrar (i) uno o más primeros polipéptidos inmunógenos formulados conjuntamente con un adyuvante; y (ii) uno o más vectores adenovirales que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más segundos polipéptidos inmunógenos; en el que uno o más primeros polipéptidos inmunógenos y adyuvante, y uno o más vectores adenovirales se administran simultáneamente.

Por "formular conjuntamente" se indica que el primer polipéptido inmunógeno y el adyuvante están contenidos dentro de la misma composición, por ejemplo una composición farmacéutica.

Normalmente, el vector adenoviral está contenido en una composición, por ejemplo una composición farmacéutica.

40 Alternativamente, el uno o más primeros polipéptidos inmunógenos, el uno o más vectores adenovirales y un adyuvante se formulan conjuntamente.

Por tanto, se proporcionan composiciones según la invención que comprenden uno o más polipéptidos inmunógenos, uno o más vectores adenovirales y un adyuvante.

45 Las composiciones y procedimientos según la divulgación pueden implicar el uso de más de un polipéptido inmunógeno y/o más de un vector adenoviral. El uso de múltiples antígenos es especialmente ventajoso para fomentar respuestas inmunitarias protectoras frente a ciertos patógenos, tales como VIH, *M. tuberculosis* y *Plasmodium sp.* Las composiciones según la invención pueden comprender más de un adyuvante.

Las composiciones y procedimientos empleados según la divulgación pueden comprender normalmente un soporte, por ejemplo un soporte acuoso tamponado. Pueden incluirse componentes protectores tales como azúcares.

Las composiciones deberían administrarse en cantidades suficientes para transducir las células diana y para proporcionar niveles suficientes de transferencia y expresión génica y para permitir que se desarrollen respuestas inmunitarias específicas de un patógenos para así proporcionar un beneficio profiláctico o terapéutico sin efectos adversos indebidos o con efectos fisiológicos médicamente aceptables, que puede determinarse por aquellos expertos en las artes médicas. Vías de administración convencionales y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, administración directa a la retina y otros procedimientos de administración intraocular, administración directa al hígado, inhalación, vía intranasal, intravenosa, intramuscular, intratraqueal, subcutánea, intradérmica, epidérmica, rectal, oral y otras vías parenterales de administración. Las vías de administración pueden combinarse, si se desean, o ajustarse dependiendo del producto génico o la afección. La vía de administración dependerá principalmente de la naturaleza de la afección que está tratándose. De manera más adecuada, la vía es intramuscular, intradérmica o epidérmica.

Tejidos preferidos para elegir como diana son músculo, piel y membranas mucosas. La piel y las membranas mucosas son los sitios fisiológicos en los que se encuentran normalmente la mayoría de los antígenos infecciosos.

Si el primer polipéptido inmunógeno, adyuvante y vector adenoviral no están formulados conjuntamente, las diferentes formulaciones (por ejemplo formulaciones de polipéptido/adyuvante y vector adenoviral) pueden administrarse por la misma vía de administración o por diferentes vías de administración.

Las dosificaciones de composiciones en los procedimientos dependerán principalmente de factores tales como la afección que está tratándose, la edad, peso y salud del sujeto y, por tanto, puede variar entre sujetos. Por ejemplo, una dosificación humana para adultos o veterinaria terapéuticamente eficaz está generalmente en el intervalo de aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 100 ml de un soporte que contiene concentraciones de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{15} partículas, aproximadamente 1×10^{11} a 1×10^{13} partículas, o aproximadamente de 1×10^9 a 1×10^{12} partículas de virus junto con aproximadamente 1-1000 μ g, o aproximadamente 2-100 μ g, por ejemplo aproximadamente 4-40 μ g de polipéptido inmunógeno. Las dosificaciones oscilarán dependiendo del tamaño del animal y la vía de administración. Por ejemplo, una dosificación humana o veterinaria adecuada (para aproximadamente un animal de 80 kg) para inyección intramuscular está en el intervalo de aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 5×10^{12} partículas de virus y 4-40 μ g de proteína por ml, para un único sitio. Un experto en la materia puede ajustar estas dosis dependiendo de la vía de administración y la aplicación terapéutica o vacunal para la que se emplea la composición.

La cantidad de adyuvante dependerá de la naturaleza del adyuvante y el polipéptido inmunógeno, de la afección que está tratándose y la edad, peso y salud del sujeto. Normalmente, para administración humana puede ser adecuada una cantidad de adyuvante de 1-100 μ g, por ejemplo 10-50 μ g por dosis.

Adecuadamente, una respuesta inmunitaria adecuada se logra mediante una única administración simultánea de la composición o composiciones de la invención en procedimientos de la invención. Sin embargo, si la respuesta inmunitaria mejora adicionalmente por la administración de otra dosis del primer polipéptido inmunógeno, adyuvante y vector adenoviral en una segunda ocasión u ocasión posterior (por ejemplo después de un mes o dos meses), entonces la invención engloba un protocolo tal.

Se ha descubierto que normalmente pueden fomentarse buenas respuestas de los linfocitos T CD4+ y/o CD8+ específicos de patógeno después de una única administración simultánea de la composición o composiciones de la invención en procedimientos de la invención. Sin embargo, se ha descubierto que las buenas respuestas de anticuerpos específicos para patógenos pueden requerir una segunda administración simultánea o adicional de la composición o composiciones de la invención.

Los componentes de la invención pueden combinarse o formularse con cualquier excipiente farmacéutico adecuado tal como agua, tampones y similares.

Ejemplos

45 Preparaciones de adyuvantes

1) La preparación de la emulsión aceite en agua siguió el protocolo como se expone en el documento WO95/17210.

La emulsión contiene: 42,72 mg/ml de escualeno, 47,44 mg/ml de tocoferol, 19,4 mg/ml de Tween 80. Las gotitas de aceite resultantes tienen un tamaño de aproximadamente 180 nm.

50 Se disolvió Tween 80 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para dar una disolución al 2 % en PBS. Para proporcionar un concentrado 2x de 100 ml, se agitaron con vórtex una emulsión de 5 g de DL alfa tocoferol y 5 ml de escualeno hasta que se mezclaron bien. Se añadieron 90 ml de disolución PBS/Tween y se mezclaron bien. Entonces, la emulsión resultante se pasó a través de una jeringa y finalmente se microfluidizó usando una máquina de microfluidica M110S. Las gotitas de aceite resultantes tienen un tamaño de aproximadamente 180 nm.

55 2) Preparación de la emulsión aceite en agua con QS21 y MPL

Se añadió una emulsión de cargar estéril PBS para alcanzar una concentración final de 500 µl de emulsión por ml (v/v). Luego se añadió 3D-MPL. Luego se añadió QS21. Entre cada adición de componente, el producto intermedio se agitó durante 5 minutos. Quince minutos después se comprobó el pH y, si fue necesario, se ajustó a 6,8 +/- 0,1 con NaOH o HCl. La concentración final de 3D-MPL y QS21 fue de 100 µg por ml para cada uno.

5 3) Preparación de MPL liposomal

Una mezcla de lípido (tal como fosfatidilcolina de yema de huevo o sintética) y colesterol y 3D-MPL en disolvente orgánico se secó a vacío (o alternativamente bajo una corriente de gas inerte). Entonces se añadió una disolución acuosa (tal como solución salina tamponada con fosfato) y el recipiente se agitó hasta que todo el lípido estuvo en suspensión. Entonces, esta suspensión se microfluidizó hasta que el tamaño del liposoma se redujo a aproximadamente 100 nm y luego se filtró estéril a través de un filtro de 0,2 µm. La extrusión o sonicación podría reemplazar esta etapa. Normalmente, la relación colesterol: fosfatidilcolina fue 1:4 (p/p) y la disolución acuosa se añadió para dar una concentración final de colesterol de 10 mg/ml.

La concentración final de MPL es 2 mg/ml.

Los liposomas tienen un tamaño de aproximadamente 100 nm y se denominan SUV (de vesículas unilaminares pequeñas). Los liposomas son estables por sí mismos con el tiempo y no tienen capacidad fusogénica.

4) Preparación del adyuvante B ("ady B")

Se añadió una cantidad estéril de SUV a PBS. La composición de PBS era Na₂HPO₄: 9 mM; KH₂PO₄: 48 mM; NaCl: 100 mM pH 6,1. Se añadió QS21 en disolución acuosa a SUV. La concentración final de 3D-MPL y QS21 fue de 100 µg por ml para cada uno. Esta mezcla se denomina **adyuvante B**. Entre cada adición de componente, el producto intermedio se agitó durante 5 minutos. El pH se comprobó y se ajustó, si fue necesario, a 6,1 +/- 0,1 con NaOH o HCl.

Preparación de la proteína p24-RT-Nef-P17 ("F4")

F4 se preparó como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO2006/013106, procedimiento de de codón optimizado.

25 Preparación del transgén Gag-RT-Nef que contiene adenovirus Pan7 de chimpancé ("Pan7GRN")

Construcción del plásmido de Gag, RT, Nef.

Plásmido p73i-Tgrn

La secuencia completa del inserto del plásmido Tgrn se facilita en SEQ ID No 1 y la construcción del plásmido se muestra gráficamente en la Fig. 1. Éste contiene p17 p24 (de codón optimizado) Gag, p66 RT (de codón optimizado e inactivado) y Nef truncado.

El plásmido P73i-Tgrn se preparó como se describe en los Ejemplos 1-13 del documento WO03/025003.

Construcción del adenovirus Pan 7 con E1/E3 eliminados

El adenovirus Pan 7 con E1/E3 eliminados se preparó como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO2006/120034.

35 Otros serotipos de vectores pueden construirse de un modo similar. En el documento WO03/0046124 se facilita una descripción completa de la construcción de las delecciones E1, E3 y E4 en éste y otros serotipos de adenovirus Pan. También hay más información disponible en Human Gene Therapy 15:519-530.

Inserción de la secuencia de Gag, RT, Nef en el adenovirus

40 Usando el plásmido P73i-Tgrn, el casete de expresión de GRN se insertó en el adenovirus Pan 7 con E1/E3 eliminados para producir C7-GRNc como se describe en el Ejemplo 3 del documento WO2006/120034. C7-GRNc es el componente del adenovirus Pan7GRN usado en los ejemplos explicados en el presente documento.

Ejemplo 1

45 Estudio de inmunogenicidad en ratones inmunizados con componente de adenovirus (Pan7GRN) y componente de proteína (F4/adyuvante B) por separado o con ambos componentes de adenovirus y proteína formulados conjuntamente

La cepa de ratón usada fue CB6F1 y para cada momento se usaron 3 ratones. Para la inmunización con F4/adyuvante B (P) se inyectó 1/10 de la dosis humana, es decir, 9 µg de proteína F4 en 50 µl de adyuvante B. Para la inmunización con Pan7GRN (A) se usaron 10 x 10⁸ partículas de virus en 50 µl de solución salina (agua con NaCl al 0,9 % para disolución de inyección). El adenovirus de chimpancé Pan7GRN lleva los genes que codifican Gag

(G), RT (R) y Nef (N).

El programa de vacunación fue del siguiente modo:

Grupo	Día 0	Día 21	Día 42	Día 63
1	-	-	F4/ady B	F4/ady B
2			Pan7GRN	Pan7GRN
3	F4/ ady B	F4/ady B	Pan7GRN	Pan7GRN
4	Pan7GRN	Pan7GRN	F4/ady B	F4/ady B
5	-	-	-	F4/ady B/Pan7GRN
6	-	-	F4/ady B/Pan7GRN	F4/ady B/Pan7GRN
7	-	-	ady B	ady B
8	-	-	-	-

5 Por tanto, puede verse que en los grupos 1 y 2 los ratones se inmunizaron con 2 inyecciones de proteína (PP) o adenovirus (AA), respectivamente. Los ratones de los grupos 3 y 4 recibieron un programa convencional de dosis de sensibilización-refuerzo: proteína luego adenovirus (PPAA) o al revés (AAPP), mientras que en los grupos 5 y 6 los ratones recibieron una o dos inyecciones de una combinación (combo) de proteína y adenovirus conjuntamente según la invención. Los ratones del grupo 7 solo recibieron control de adyuvante, mientras que los ratones del grupo 6 no recibieron tratamiento previo.

10 Se realizaron las siguientes lecturas:
Respuestas de anticuerpos (se realizaron ELISA en los sueros de cada animal individual de cada grupo):

- respuesta de anticuerpos frente a F4 (Figura 4)
- respuesta de anticuerpos frente a componentes de F4 p24, RT, Nef y p17 (Figura 5-8)

Respuestas celulares (Figuras 2-3):

15 - medidas por citometría de flujo tras la tinción de citocinas superficiales e intracelulares después de reestimulación durante la noche de células del bazo con mezclas de péptidos de p24, RT, Nef o p17. Para el análisis, las células del bazo de 3 ratones se mezclaron para cada momento y por grupo.

20 Para los grupos 1 y 2, las muestras se tomaron para la medición 21 días después de la inmunización final correspondiente. Para los grupos restantes, las mediciones se tomaron 21 días, 56 días y 112 días después de la inmunización final correspondiente.

Resultados:

Los resultados se muestran en las Figuras 2-8.

Las marcas del eje X se corresponden del siguiente modo:

- 25
- PP - Animales del grupo 1 tras la segunda inmunización
 - AA - Animales del grupo 2 tras la segunda inmunización
 - PPAA - Animales del grupo 3 tras la cuarta inmunización
 - AAPP - Animales del grupo 4 tras la cuarta inmunización
 - Combo - Animales del grupo 5 tras la inmunización
 - Combo x 2 - Animales del grupo 6 tras la segunda inmunización

30 Los momentos de medición (21, 56 o 112 días después de la última inmunización) se indican entre paréntesis.

Respuestas celulares (Figura 2-3):

En los momentos analizados, los datos muestran que las respuestas de linfocitos T CD4+ se observaron principalmente frente a p24, RT y Nef.

35 Como se muestra en las Figuras 2a y 2b (paneles izquierdos), 21 días después de la última inmunización, las mayores respuestas de linfocitos T CD4+ se observan con dos inmunizaciones de adenovirus seguidas por dos inmunizaciones de proteína/adyuvante (animales del grupo 4). Una inyección de la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante induce mayores niveles de linfocitos T CD4+ que dos inyecciones de

proteína/adyuvante tras la reestimulación con péptidos de p24, RT o Nef.

Para la reestimulación por RT y Nef, dos inmunizaciones con la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante induce una respuesta de linfocitos T CD4+ ligeramente superior que una inmunización con la combinación, mientras que las respuestas con una o dos inmunizaciones fueron idénticas para p24.

- 5 En los momentos analizados, las respuestas de linfocitos T CD8+ se observan principalmente frente a los péptidos de p24 y RT, y no se detectaron números significativos de linfocitos T CD8+ específicos para Nef o p17. Como se muestra en las Figuras 2a y 2b (paneles derechos), 21 días después de la última inmunización las respuestas de linfocitos T CD8+ fueron similares después de una o dos inmunizaciones con la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante. Las respuestas de CD8 frente a p24 observadas en grupos inmunizados o (i) dos veces con adenovirus o (ii) dos veces con adenovirus seguido por dos veces con proteína o (iii) una vez o dos veces con la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante fueron comparables entre sí y ligeramente inferiores a las del grupo inmunizado dos veces con proteína seguida por dos veces con adenovirus. Las respuestas de CD8 frente a RT observadas en grupos inmunizados una vez o dos veces con la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante fueron comparables y ligeramente inferiores a las de grupos inmunizados o (i) dos veces con adenovirus o (ii) dos veces con adenovirus seguido por dos veces con proteína o (iii) dos veces con proteína seguida por dos veces con adenovirus.

Las respuestas de linfocitos T CD4 y CD8 también se analizaron en momentos posteriores (56 y 112 días después de la última inmunización) cuando puede determinarse la persistencia de las respuestas (Figuras 3a y 3b). Las respuestas de CD4 (Fig. 3a y 3b, paneles izquierdos) se observan principalmente frente a p24, RT y Nef. En estos momentos, las mayores respuestas de CD4 se observan en los animales inmunizados dos veces con adenovirus seguido por dos veces con proteína. Las respuestas de CD4 en ratones inmunizados una vez o dos veces con la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante fueron comparables entre sí y generalmente mayores que las respuestas observadas en grupos inmunizados dos veces con proteína seguida por dos veces con adenovirus.

En los últimos momentos, la respuesta de CD8 frente a p24 es la mayor en el grupo inmunizado una vez con la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante (Fig. 3b, panel derecho). Es comparable a la de animales inmunizados dos veces con proteína seguida por dos veces con adenovirus y ligeramente mayor que la de los animales inmunizados o (i) dos veces con la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante o (ii) dos veces con adenovirus seguido por dos veces con proteína. Estas dos últimas son comparables entre sí. La respuesta de CD8 frente a RT es la mayor y similar en grupos inmunizados (i) dos veces con la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante o (ii) dos veces con adenovirus seguido por dos veces con proteína. Las respuestas de CD8 frente a RT de grupos inmunizados (i) dos veces con la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante o (ii) dos veces con proteína seguida por dos veces con adenovirus fueron ligeramente inferiores, pero comparables entre sí (Figura 3). Como se muestra en la Figura 3a (panel derecho), no se detectaron números significativos de linfocitos T CD8+ específicos para Nef o p17.

35 Respuestas de anticuerpos:

Como se muestra en las Figuras 4 a 8, las respuestas de anticuerpos detectados están principalmente dirigidas contra p24 (Fig. 5), RT (Fig. 6) y Nef (Fig. 8). La respuesta anti-F4 (Fig. 4) imita generalmente la respuesta observada frente a cada uno de los componentes p24, RT o Nef y puede caracterizarse del siguiente modo:

- 40 - Se detecta una respuesta de anticuerpos baja o nula, en grupos inmunizados (i) dos veces con adenovirus o (ii) una vez con la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante;
- Las mayores respuestas de anticuerpos se detectaron normalmente en el grupo inmunizado dos veces con la proteína 21 días después de la inmunización. Sin embargo, en este grupo también se observa la mayor variabilidad entre individuos. Además, para la serología de anti-Nef, parece que el grupo inmunizado dos veces con adenovirus seguido por dos veces con proteína muestra la mayor respuesta, cuando se compara con los otros grupos;
- 45 - Las respuestas observadas en grupos inmunizados (i) dos veces con la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante o (ii) dos veces con proteína seguida por dos veces con adenovirus o (iii) dos veces con adenovirus seguido por dos veces con proteína son comparables, valor máximo 21 días después de la última inmunización y luego disminuyen ligeramente con el tiempo.

50 Las respuestas de anticuerpos frente a p17 (Fig. 7) fueron de muy bajas a indetectables en todos los grupos.

Conclusión:

En general, la mayor respuesta inmunitaria mediada por células específicas para antígenos se observa en el grupo de tratamiento con AAPP después de 4 inmunizaciones. Sin embargo, cuando se comparan grupos después de 2 inmunizaciones (es decir, grupos de AA, PP y 2 x combo), la inducción de ambas respuestas de linfocitos T CD4 y CD8 específicos para antígenos solo se observa en el grupo inmunizado dos veces con la combinación de proteína/adenovirus/adyuvante. Además, pueden alcanzarse niveles similares de respuestas de linfocitos T CD4 y CD8 después de una única inyección de la combinación de proteína/adenovirus/adyuvante. Además, en términos de persistencia, las respuestas de linfocitos T específicos para antígenos observadas 112 días después de la 2ª inmunización con la combinación de proteína/adenovirus/adyuvante son comparables a las observadas 112 días

después de la 4ª inmunización en el grupo de tratamiento con AAPP. Finalmente, parece que se necesitan 2 inmunizaciones con la combinación de proteína/adenovirus/adyuvante para obtener una respuesta de anticuerpos comparable a la obtenida en el grupo inmunizado dos veces con la proteína con adyuvante, grupo que en general proporcionó las mayores respuestas de anticuerpos.

5 Ejemplo 2

Estudio de inmunogenicidad en ratones inmunizados con adenovirus Pan7GRN y proteína F4 /adyuvante B formulados conjuntamente

La cepa de ratón usada fue CB6F1 con 9 ratones por grupo. Los ratones se inmunizaron una vez con una formulación conjunta de la proteína F4 (se inyectó 1/10 de la dosis humana, es decir, 9 ug) junto con 10×10^8 partículas de virus (vp) de Pan7GRN, en 50 ul de adyuvante B o una dilución de este último (1/2, 1/4 o 1/10). Las respuestas celulares de CD4 y CD8 frente a una mezcla de péptidos Nef, p17, p24 o RT se determinaron 21 días después de la inmunización (3 mezclas de 3 bazos para cada grupo).

Se realizó la siguiente lectura:

Respuestas celulares (Figura 9):

- 15 - medidas por citometría de flujo tras la tinción de citocinas superficiales e intracelulares después de reestimulación durante la noche de células del bazo con mezclas de péptidos de p24, RT, Nef o p17. Para el análisis se mezclaron las células del bazo (3 mezclas de 3 bazos por grupo).

Resultados:

Los resultados mostrados en la Figura 9 representan las respuestas celulares observadas después de la reestimulación con una mezcla de péptidos de p24 o RT.

Las marcas del eje X se corresponden del siguiente modo:

- 25 Ady B - Ratones inmunizados con 9 μ g de F4/ 10^8 vp de Pan7GRN/ adyuvante B sin diluir
- 1/2 Ady B - Ratones inmunizados con 9 μ g de F4/ 10^8 vp de Pan7GRN/ adyuvante B diluido 1/2
- 1/4 Ady B - Ratones inmunizados con 9 μ g de F4/ 10^8 vp de Pan7GRN/ adyuvante B diluido 1/4
- 1/10 Ady B - Ratones inmunizados con 9 μ g de F4/ 10^8 vp de Pan7GRN/ adyuvante B diluido 1/10
- Sin tratamiento previo - Ratones sin tratamiento previo (sin inmunización)

Los resultados indican que las respuestas de CD4 (Figura 9, panel izquierdo) y CD8 (Figura 9, panel derecho) se observan principalmente frente a p24 y RT, siendo la respuesta de linfocitos T CD8 específicos para RT inferior a los específicos para p24. Además, los resultados indican que las respuestas de CD4 frente a p24 y RT 21 días después de las inmunizaciones en los grupos inmunizados con el adyuvante B sin diluir o una dilución de 1/2 del mismo son similares. Estas respuestas de CD4 tienden a disminuir cuando el adyuvante se diluye 1/4. Si el adyuvante B se diluye 1/10, las respuestas de CD4 observadas son similares a las de los grupos inmunizados con la dilución de 1/4 del adyuvante B. Las respuestas anti-CD8 frente a p24 son comparables tanto si el adyuvante se diluye 1/2 como si no. Sin embargo, la respuesta disminuye cuando el adyuvante B se diluye 1/4 e incluso tanto más si se diluye 1/10. A diferencia, tales tendencias no se ven para las respuestas de CD8 anti-RT en las que no hay un efecto del intervalo de dosis real de la dosis de adyuvante usada.

Conclusión:

Se indujeron células CD4+ y células CD8+ frente a los componentes de F4 mediante una única administración de una composición que contenía un polipéptido inmunógeno, un vector adenoviral que contenía un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido inmunógeno y un adyuvante, aún cuando éste último se diluyó. El impacto de la dilución del adyuvante fue distinto dependiendo de las respuestas de CD4 o CD8 específicos para antígenos de interés. En particular, las mayores respuestas observadas fueron frente a p24 y las respuestas de linfocitos T CD4 y CD8 anti-p24 muestran un efecto del intervalo de dosis que guarda relación con la dosis de adyuvante usada en la vacuna de la combinación. Aunque puede observarse el mismo efecto para la respuesta de linfocitos T CD4 anti-RT, el efecto del intervalo de dosis de la dosis de adyuvante usada en el combo es menos clara para la respuesta de linfocitos T CD8 anti-RT. Finalmente, puede observarse un intervalo de dosis si se consideran las respuestas globales de linfocitos T CD4 y CD8 específicos para antígenos y se suman las respuestas frente a los 4 antígenos.

Ejemplo 3:

Estudio de inmunogenicidad en conejos blancos Nueva Zelanda inmunizados con Pan7GRN o F4/adyuvante B secuencialmente o con ambos componentes de adenovirus y proteína formulados conjuntamente

Para la inmunización con F4/adyuvante B se inyectó la dosis humana, es decir, 90 ug de proteína F4, en 500 ul de adyuvante B. Para la inmunización con Pan7GRN se usaron 10×10^{10} o 10×10^{12} partículas de virus (vp) en 500 ul de solución salina. Para la inmunización con tanto los componentes de adenovirus como de proteína formulados

ES 2 744 676 T3

conjuntamente se usaron 90 µg de proteína F4, 10 x 10¹¹ partículas de virus (vp) de Pan7GRN en 500 ul de adyuvante B.

El programa de vacunación fue del siguiente modo:

Grupo	Día 0	Día 14	Día 126
1	F4/ ady B	F4/ ady B	F4/ady B
2	Pan7GRN 10 ¹⁰		Pan7GRN 10 ¹⁰
3	Pan7GRN 10 ¹²		Pan7GRN 10 ¹²
4	F4/ady B/ Pan7GRN 10 ¹¹	F4/ady B/Pan7GRN 10 ¹¹	F4/ady B/Pan7GRN 10 ¹¹

5 Hubo 3 conejos por grupo, excepto el grupo 1 que solo incluyó 2 conejos.

Se realizaron las siguientes lecturas:

Respuestas de anticuerpos (se realizaron ELISA en los sueros de cada animal individual de cada grupo):

- respuesta de anticuerpos frente a F4
- respuesta de anticuerpos frente a componentes de F4 p24, RT, Nef y p17

10 Respuestas linfoproliferativas:

La linfoproliferación se determinó por la captación de timidina tritiada por células mononucleares de la sangre periférica (aisladas a partir de sangre completa después de un gradiente de densidad) reestimuladas *in vitro* con mezclas de péptidos de Nef, p17, p24 y/o RT durante 88 horas en presencia de timidina tritiada durante las 16 últimas horas de la incubación.

15 Resultados:

Respuesta linfoproliferativa:

Como se muestra en la Figura 10, las mayores respuestas linfoproliferativas se observan en el grupo inmunizado dos veces con proteína. La respuesta linfoproliferativa de animales inmunizados dos veces con la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante se observó en todos los conejos del grupo. En realidad alcanzó el valor máximo después de una inyección y podría haberse recordado adicionalmente (a niveles similares a después de la 1^a inyección) tras una tercera inyección de la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante, sugiriendo que las dos primeras inyecciones no indujeron una respuesta neutralizadora que inhibiera cualquier respuesta a otra inyección similar. En su intensidad, la respuesta proliferativa observada en conejos inmunizados con la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante fue comparable a la observada en animales inmunizados una vez o dos veces con 10¹² partículas virales (vp) de adenovirus y pareció mayor que la de animales inmunizados una vez o dos veces con 10¹⁰ partículas virales (vp) de adenovirus. En general, esto sugiere que el uso de la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante podría disminuir la dosis de adenovirus a usar. Finalmente, después de una tercera inyección de la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante, la respuesta observada en el grupo 4 fue similar a la de animales inmunizados 3 veces con la proteína (grupo 1).

30 Serología:

Como se muestra en la Figura 11, la cinética de la respuesta de anticuerpos anti-F4 observada en los animales inmunizados dos veces con la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante es similar a la de animales inmunizados dos veces con la proteína: ya se ha detectado 7 días después de la 2^a inyección y luego disminuye con el tiempo. Sin embargo, en términos de intensidad, la respuesta anti-F4 de animales inmunizados dos veces con la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante permanece mayor en los últimos momentos (21 y 63 días después de la 2^a inmunización) cuando se compara con la respuesta anti-F4 de animales inmunizados dos veces con la proteína. No se observa respuesta de anticuerpos anti-F4 en conejos inmunizados una vez con 10¹⁰ partículas virales de adenovirus. En conejos inmunizados una vez con 10¹² partículas virales de adenovirus solo se detecta una respuesta anti-F4 21 y 63 días después de la inmunización. En ese grupo, la alta variabilidad de la respuesta observada en el día 63 después de la inmunización (d 77) resulta el hecho de que un único animal (de los 3) muestra mayores títulos frente a los diferentes componentes de F4, especialmente p24 y RT como se muestra en las Figuras 12a y 12b, respectivamente. La respuesta de anticuerpos anti-F4 se compone principalmente de anticuerpos que eligen como diana p24 y RT y en mucha menor medida Nef y p17.

Conclusión:

45 Las respuestas linfoproliferativas y de anticuerpos podrían inducirse en conejos después de dos inyecciones de una composición que contiene un polipéptido inmunógeno, un vector adenoviral que contiene un polinucleótido

heterólogo que codifica un polipéptido inmunógeno y un adyuvante. Además, hay pruebas de que una respuesta linfoproliferativa puede recordarse después de una tercera inyección de tal composición. Finalmente, la mejor respuesta de anticuerpos (en intensidad y persistencia) se observa con la combinación de adenovirus/proteína/adyuvante.

5 Ejemplo 4

Inmunogenicidad de F4 (de codón optimizado)/adyuvante B y C7-GRN cuando se administra como una combinación en ratones CB6F1.

Diseño experimental

10 Ratones CB6F1 se inmunizaron dos veces (días 0 y 21) con diferentes combinaciones enumeradas más adelante. Se usó F4co/adyuvante B a 9 µg de F4co/animal en 50 µl de adyuvante B (1/10 de la dosis humana) y el virus C7-GRN a 10⁸ partículas virales/animal. F4co en el ejemplo 4 es F4 preparado como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO2006/013106, procedimiento de de codón optimizado.

Combinaciones

15 C7-GRN
C7-GRN/ adyuvante B
C7-GRN/ F4co
C7-GRN/ F4co/ adyuvante B
F4co
20 F4co/ adyuvante B
adyuvante B
C7 vacío
C7 vacío/ adyuvante B
C7 vacío/ F4co
C7 vacío/ F4co/ adyuvante B

25 Programa de inmunizaciones y análisis de respuestas inmunitarias

Las inmunizaciones se llevaron a cabo en el día 0 y día 21. La tinción de citocinas intracelulares (ICS) se llevó a cabo a 21 días, 28 días (7 días después de la inmunización 2), 42 días (21 días después de la inmunización 2) y 77 días (56 días después de la inmunización 2).

Resultados

30 Respuestas de linfocitos T CD4 específicos para VIH

Los resultados se muestran en las siguientes figuras:

35 Figura 13. Cuantificación de linfocitos T CD4 específicos para VIH-1. Para cada protocolo de inmunización se representa el % de linfocitos T CD3 CD4 que secretan IFN-γ y/o IL-2 en cuatro momentos. Se estimularon linfocitos de la sangre periférica (PBL) *ex vivo* (2 horas antes de la adición de la brefeldina, luego durante la noche) con una mezcla de péptidos que incluía la secuencia de F4 y la producción de citocinas se midió mediante ICS. Cada valor es la media geométrica de 5 mezclas de 3 ratones.

40 Figura 14. Distribución de la frecuencia de linfocitos T CD4 específicos para F4 7 días después de dos inmunizaciones. Para cada protocolo se representa la frecuencia de linfocitos T CD4 circulantes específicos para F4 7 días después de dos inmunizaciones. Cada punto representa el valor obtenido para una mezcla de 3 ratones.

Figura 15. Producción de citocinas de linfocitos T CD4 específicos para F4 7 días después de dos inmunizaciones. El % de linfocitos T CD4 específicos para F4 que secretan IL-2 y/o IFN-γ se representa para 5 mezclas de 3 ratones. Se presentan los resultados de la inmunización con F4co/ adyuvante B (A), F4co/ adyuvante B /C7 vacío (B) y F4co/ adyuvante B /C7-GRN (C).

45 La frecuencia de linfocitos T CD4 circulantes específicos para F4 alcanza el 2,82 % 21 días después de dos inmunizaciones con la combinación F4co/ adyuvante B y desciende hasta el 0,91 % 56 días después de la inmunización (Figura 13). Dos dosis del virus C7-GRN en solitario dan como resultado el 0,52 % de linfocitos T CD4 circulantes específicos para F4 21 días después de la última inmunización y la presencia del adyuvante adyuvante B no altera esta respuesta.

50 La presencia del vector C7 vacío o el virus C7-GRN recombinante, además de la mezcla F4co/ adyuvante B, no aumenta ni interfiere con la frecuencia de respuesta de linfocitos T CD4 específicos para F4 (3,58 % y 2,82 % respectivamente, 21 días después de la última inmunización). Aunque no se han realizado análisis estadísticos, la distribución de poblaciones sugiere que la intensidad de las respuestas de linfocitos T CD4 específicos para F4 no

es diferente entre los tres protocolos F4co/ adyuvante B, F4co/ adyuvante B /C7 vacío y F4co/ adyuvante B /C7-GRN (Figura 14). Como es de esperar, la administración de F4co sin adyuvante B no induce linfocitos T CD4 específicos para F4 significativas.

5 El perfil de la producción de citocinas muestra que después de la inmunización con F4co/ adyuvante B, los linfocitos T CD4 específicos para F4 secretan tanto IFN- γ como IL-2. La adición de C7 vacío o C7-GRN en el protocolo de inmunización no altera este perfil.

Como resultado, estos datos sugieren que la mayor respuesta de linfocitos T CD4 específicos para F4 se obtiene después de la inmunización con la combinación de F4co/ adyuvante B y que la presencia del virus C7-GRN no mejora ni altera esta respuesta.

10 Respuestas de linfocitos T CD8 específicos para antígenos

Los resultados se muestran en las siguientes figuras

15 Figura 16. Cuantificación de linfocitos T CD8 específicos para VIH-1. Para cada protocolo de inmunización se representa el % de linfocitos T CD3 CD8 que secretan IFN- γ y/o IL-2 en cuatro momentos. Se estimularon linfocitos de la sangre periférica (PBL) *ex vivo* (2 horas antes de la adición de la brefeldina, luego durante la noche) con una mezcla de péptidos que incluía F4 y la producción de citocinas se midió mediante ICS. Cada valor es la media geométrica de 5 mezclas de 3 ratones.

20 Figura 17. Producción de citocinas de linfocitos T CD8 específicos para F4 7 días después de dos inmunizaciones. El % de linfocitos T CD8 específicos para F4 que secretan IL-2 y/o IFN- γ se representa para 5 mezclas de 3 ratones. Se presentan los resultados de la inmunización con C7-GRN (**A**), C7-GRN/ adyuvante B (**B**) y C7-GRN+F4co/ adyuvante B (**C**).

25 Después de una inyección, el vector recombinante C7-GRN induce una alta frecuencia de linfocitos T CD8 circulantes específicos para F4 (9,70 % de los linfocitos T CD8 totales, 21 días después de la inmunización) (Figura 4). Una segunda inyección no refuerza la respuesta de linfocitos T CD8 específicos para F4. La combinación de F4co/ adyuvante B induce linfocitos T CD8 específicos para F4 de bajas a indetectables y añadiendo esta combinación a C7-GRN no se mejora o altera la respuesta de linfocitos T CD8 específicos para F4.

La respuesta de linfocitos T CD8 específicos para F4 se retrasa cuando el adyuvante B se añade a C7-GRN, pero alcanza el mismo nivel que con C7-GRN solo o la combinación de C7-GRN/F4co/ adyuvante B 21 días después de la segunda inmunización.

30 Los linfocitos T CD8 específicos para F4 secretan principalmente IFN- γ tanto si el vector de C7-GRN se inyecta solo como si se inyecta en combinación con F4co/ adyuvante B (Figura 17).

Curiosamente, la respuesta de linfocitos T CD8 específicos para F4 persiste sin decaer hasta 56 días después de la última inmunización, sugiriendo que el vector de C7 provoca linfocitos T CD8 altos y persistentes.

Conclusiones

35 La vacuna de F4co/adyuvante B induce una alta frecuencia de linfocitos T CD4 específicos para VIH polifuncional, pero no linfocitos T CD8 específicos para VIH en ratones CB6F1. En el mismo modelo animal, el adenovirus recombinante C7 que expresa Gag, RT y Nef (Ad C7-GRN) induce una alta respuesta de linfocitos T CD8 específicos para antígenos y linfocitos T CD4 específicos para antígenos de bajas a indetectables. Una combinación de F4/ adyuvante B y Ad C7-GRN provoca al mismo tiempo tanto linfocitos T CD4 como CD8 específicos para antígenos. Una combinación de los tres componentes, F4co, adyuvante B y C7-GRN provoca al mismo tiempo los mayores niveles de tanto linfocitos T CD4 como CD8 específicos para antígenos.

La combinación de F4/ adyuvante B y Ad C7-GRN tiene un efecto aditivo en lo referente a la intensidad de ambos brazos de la respuesta inmunitaria celular. En este modelo queda por determinar el efecto de la respuesta de linfocitos T CD4 específicos para antígenos en la funcionalidad de la respuesta de linfocitos T CD8 específicos para antígenos.

45 **Ejemplo de referencia 5**

Inmunogenicidad del adenovirus C7 de chimpancé que expresa la construcción CS2 de la proteína CSP a partir de *Plasmodium falciparum* (C7-CS2) cuando se administra solo

Diseño experimental:

50 Ratones CB6F1 se inmunizaron una vez intramuscularmente con un intervalo de dosis (10^{10} , 10^9 y 10^8 partículas virales) del adenovirus C7 de chimpancé que expresa el antígeno de la malaria CSP, y las respuestas de linfocitos T CD4 y CD8 específicos para CSP (extremo C y extremo N) se determinaron 21, 28 y 35 días después de la inyección por ICS (tinción de citocinas intracelulares).

Respuestas de linfocitos T CD4 específicos para CSP

Los resultados se muestran en las siguientes figuras:

5 Figura 18. Cuantificación de linfocitos T CD4 específicos para CSP. Para cada protocolo de inmunización se representa el % de linfocitos T CD4 que secretan IFN- γ y/o IL-2 en tres momentos. Se estimularon *ex vivo* linfocitos de la sangre periférica (PBL) (2 horas antes de la adición de la brefeldina, luego durante la noche) con una mezcla de péptidos que incluía las secuencias del extremo N de CSP o del extremo C de CSP y la producción de citocinas se midió mediante ICS. Se sumaron las respuestas a las mezclas de péptidos del extremo C y extremo N y cada valor es el promedio de 5 mezclas de 4 ratones.

10 Figura 19. Cuantificación de linfocitos T CD8 específicos para CSP. Para cada protocolo de inmunización se representa el % de linfocitos T CD8 que secretan IFN- γ y/o IL-2 en tres momentos. Se estimularon *ex vivo* linfocitos de la sangre periférica (PBL) (2 horas antes de la adición de la brefeldina, luego durante la noche) con una mezcla de péptidos que incluía las secuencias del extremo N de CSP o del extremo C de CSP y la producción de citocinas se midió mediante ICS. Se sumaron las respuestas a las mezclas de péptidos del extremo C y extremo N y cada valor es el promedio de 5 mezclas de 4 ratones.

15 Estos resultados indican que tanto las dosis de 10^{10} como de 10^9 de C7-CS2 provocan niveles similares de respuestas de linfocitos T CD4 específicos para CSP (valor máximo del 0,5 %) y niveles similares de respuestas de linfocitos T CD8 específicos para CSP (valor máximo del 8 %). La dosis de 10^{10} de C7-CS2 se eligió en experimentos posteriores en los que se probó la inmunogenicidad de C7-CS2 en combinación con RTS,S (véase más adelante).

20 **Ejemplo de referencia 6**

Inmunogenicidad de C7-CS2 y RTS,S cuando se administran como una combinación en ratones CB6F1

Diseño experimental:

25 Ratones CB6F1 se inmunizaron tres veces intramuscularmente (día 0, 14 y 28) con o una combinación del candidato a la vacuna de la malaria RTS,S (5 μ g) en 50 μ l de adyuvante B (denominado P-P-P en las figuras de más adelante) o una combinación de RTS,S (5 μ g) y C7-CS2 (10^{10} partículas virales) en 50 μ l de adyuvante B (denominado C-C-C en las figuras de más adelante). Las respuestas de linfocitos T CD4 y CD8 específicos para CSP (extremo C y extremo N) se determinaron en los siguientes momentos:

- 7 días después de 2 inmunizaciones
- 7, 21, 35 y 49 días después de 3 inmunizaciones

30 Las respuestas de linfocitos T específicos para CSP se determinaron mediante ICS (tinción de citocinas intracelulares).

Las respuestas de anticuerpos específicos para CSP en los sueros de animales inmunizados también se determinaron mediante ELISA 14 y 42 días después de la 3^a inmunización.

Respuestas de linfocitos T CD4 específicos para CSP

35 Los resultados se muestran en las siguientes figuras:

40 Figura 20. Cuantificación de linfocitos T CD4 específicos para (el extremo N de) CSP. Para cada protocolo de inmunización se representa el % de los linfocitos T CD4 que secretan IFN- γ y/o IL-2 en cinco momentos. Se estimularon *ex vivo* linfocitos de la sangre periférica (PBL) (2 horas antes de la adición de la brefeldina, luego durante la noche) con una mezcla de péptidos que incluía la secuencia del extremo N de CSP y la producción de citocinas (IFN γ y/o IL-2) se midió mediante ICS. Cada valor es el promedio de 4 mezclas de 7 ratones.

45 Figura 21. Cuantificación de linfocitos T CD4 específicos para (el extremo C de) CSP. Para cada protocolo de inmunización se representa el % de los linfocitos T CD4 que secretan IFN- γ y/o IL-2 en cinco momentos. Se estimularon *ex vivo* linfocitos de la sangre periférica (PBL) (2 horas antes de la adición de la brefeldina, luego durante la noche) con una mezcla de péptidos que incluía la secuencia del extremo C de CSP y la producción de citocinas (IFN γ y/o IL-2) se midió mediante ICS. Cada valor es el promedio de 4 mezclas de 7 ratones.

Estos resultados indican que los ratones inmunizados con 3 inyecciones de la combinación [RTS,S + C7-CS2 10^{10} + adyuvante B] muestran mayores respuestas de linfocitos T CD4 específicos para antígenos (tanto frente a la parte del extremo C como del extremo N de CSP) que los ratones inmunizados con 3 inyecciones de RTS,S + adyuvante B.

50 Respuestas de linfocitos T CD8 específicos para CSP

Los resultados se muestran en las siguientes figuras:

Figura 22. Cuantificación de linfocitos T CD8 específicos para (el extremo N de) CSP. Para cada protocolo de inmunización se representa el % de linfocitos T CD8 que secretan IFN- γ y/o IL-2 en cinco momentos. Se estimularon *ex vivo* linfocitos de la sangre periférica (PBL) (2 horas antes de la adición de la brefeldina, luego durante la noche) con una mezcla de péptidos que incluía la secuencia del extremo N de CSP y la producción de citocinas (IFN γ y/o IL-2) se midió mediante ICS. Cada valor es el promedio de 4 mezclas de 7 ratones.

Figura 23. Cuantificación de linfocitos T CD8 específicos para (el extremo C de) CSP. Para cada protocolo de inmunización se representa el % de linfocitos T CD8 que secretan IFN- γ y/o IL-2 en cinco momentos. Se estimularon *ex vivo* linfocitos de la sangre periférica (PBL) (2 horas antes de la adición de la brefeldina, luego durante la noche) con una mezcla de péptidos que incluía la secuencia del extremo C de CSP y la producción de citocinas (IFN γ y/o IL-2) se midió mediante ICS. Cada valor es el promedio de 4 mezclas de 7 ratones.

Estos resultados indican que los ratones inmunizados con 3 inyecciones de la combinación [RTS,S + C7-CS2 10^{10} + adyuvante B] muestran mayores respuestas de linfocitos T CD8 específicos para antígenos (tanto frente a la parte del extremo C como del extremo N de CSP) que los ratones inmunizados con 3 inyecciones de RTS,S + adyuvante B.

Respuestas de anticuerpos específicos para CSP

Los resultados se muestran en la siguiente figura:

Figura 24. Cuantificación de títulos de anticuerpos específicos para CSP. Los sueros de los ratones se recogieron 14 y 42 días después de la 3^a inmunización. Los títulos de anticuerpos anti-CSP se midieron en cada uno de estos sueros individuales mediante ELISA. Los datos mostrados es la media geométrica de títulos de anticuerpos \pm intervalo de confianza del 95 %.

Estos resultados indican que los ratones inmunizados con 3 inyecciones de la combinación [RTS,S + C7-CS2 10^{10} + adyuvante B] muestran títulos de anticuerpos específicos para CSP similares a los de los ratones inmunizados con 3 inyecciones de RTS,S + adyuvante B.

Conclusiones

La vacuna de RTS,S/adyuvante B induce una alta frecuencia de linfocitos T CD4 específicos para el extremo C de CSP, pero no de linfocitos T CD4 específicos para el extremo N de CSP. Además, la vacuna de RTS,S/adyuvante B induce linfocitos T CD8 específicos para el extremo C y N de CSP de bajas a indetectables. En el mismo modelo animal, el adenovirus recombinante C7 que expresa CSP induce altas respuestas de linfocitos T CD8 específicos para (el extremo C y el extremo N de) CSP e inferiores respuestas de linfocitos T CD4 específicos para (el extremo C y el extremo N de) CSP. Una combinación de RTS,S/ adyuvante B y Ad C7-CS2 provoca al mismo tiempo altos niveles de tanto linfocitos T CD4 como CD8 específicos para (el extremo C y el extremo N de) CSP. La combinación de RTS,S/ adyuvante B y Ad C7-CS2 tiene un efecto aditivo en lo referente a la intensidad de ambos brazos de la respuesta de linfocitos T. Finalmente, la combinación de RTS,S/ adyuvante B y Ad C7-CS2 provoca altos niveles de respuestas de anticuerpos específicos para CSP que son comparables a las inducidas por RTS,S/adyuvante B.

SECUENCIAS

SEQ ID No 1:

ES 2 744 676 T3

1 atgggtgccc gagcttcggt actgtctggt ggagagctgg acagatggga
 51 gaaaattagg ctgcgcccgaggaggcaaaaa gaaatacaag ctcaagcata
 101 tcgtgtgggc ctcgagggag cttgaacggt ttgccgtgaa cccaggcctg
 151 ctggaaacat ctgagggatg tcgccagatc ctggggcaat tgcagccatc
 201 cctccagacc gggagtgaag agctgaggtc cttgtataac acagtggcta
 251 cectctactg cgtacaccag aggatcgaga ttaaggatac caaggaggcc
 301 ttggacaaaa ttgaggagga gcaaaaacag agcaagaaga agggccagca
 351 ggcagctgct gacactgggc atagcaacca ggtatcacag aactatccta
 401 ttgtccaaaa cattcagggc cagatgggtc atcaggccat cagcccccg
 451 acgctcaatg cctgggtgaa ggttgtcgaa gagaaggcct tttctcctga
 501 ggttatcccc atgtttctcg ctttgagtga gggggccact cctcaggacc
 551 tcaatacaat gcttaatacc gtggcggcc atcaggccgc catgcaaatg
 601 ttgaaggaga ctatcaacga ggaggcagcc gagtgggaca gagtgcattc
 651 cgtcccagct ggcccaatcg cggccggaca gatgcccggag cctcggcgt
 701 ctgacattgc cggcaccacc tctacactgc aagagcaaat cggatggatg
 751 accaacaatc ctcccatccc agttggagaa atctataaac ggtggatcat
 801 cctgggcctg aacaagatcg tgcgatgta ctctccgaca tccatccttg
 851 acattagaca gggacccaaa gagcctttta gggattacgt cgaccggttt
 901 tataagacc ctcgagcaga gcaggcctct caggaggtca aaaactggat
 951 gacggagaca ctccctggtac agaacgctaa ccccgactgc aaaacaatct
 1001 tgaaggcact agggccggct gccaccctgg aagagatgat gaccgctgt
 1051 cagggagtag gcggaccgg acacaaagcc agagtgtga tggccccat
 1101 cagtcccatc gagaccgtgc cgtggaagct gaaaccggg atggaccggcc
 1151 ccaaggtcaa gcagtggcca ctaccgagg agaagatcaa ggcctggtg
 1201 gagatctgca ccgagatgga gaaagagggc aagatcagca agatcgggcc
 1251 ggagaacca tacaacacc ccgtgtttgc catcaagaag aaggacagca
 1301 ccaagtggcg caagctggtg gatttccggg agctgaataa gcggaccag
 1351 gatttctggg aggtccagct gggcatcccc catccggccg gcctgaagaa
 1401 gaagaagagc gtgaccgtgc tggacgtggg cgacgcttac ttcagcgtcc
 1451 ctctggacga ggactttaga aagtacacc cctttaccat cctcctatc
 1501 aacaacgaga cccctggcat cagatatcag tacaacgtcc tccccaggg
 1551 ctggaagggc tctcccgcca ttttccagag ctccatgacc aagatcctgg
 1601 agccgtttcg gaagcagaac cccgatatcg tcatctacca gtacatggac
 1651 gacctgtacg tgggctctga cctggaaatc gggcagcatc gcacgaagat
 1701 tgaggagctg aggcagcatc tgctgagatg gggcctgacc actccggaca
 1751 agaagcatca gaaggagccg ccattcctga agatgggcta cgagctccat
 1801 cccgacaagt ggaccgtgca gcctatcgtc ctccccgaga aggacagctg
 1851 gaccgtgaac gacatccaga agctgggtgg caagctcaac tgggctagcc
 1901 agatctatcc cgggatcaag gtgcgccagc tctgcaagct cctgcccggc
 1951 accaaggccc tgaccgaggt gattcccctc acggaggaag ccgagctcga
 2001 gctggctgag aaccgggaga tctgaagga gccctgacac ggcgtgtact
 2051 atgacccctc caaggacctg atcggcgaaa tccagaagca gggccagggg
 2101 cagtggacat accagattta ccaggacct ttcaagaacc tcaagaccgg
 2151 caagtacgcc cgcagaggg gcgccacac caacgatgtc aagcagctga
 2201 ccgaggccgt ccagaagatc acgaccgagt ccattcgtgat ctgggggaag
 2251 acacccaagt tcaagctgcc tatccagaag gagacctggg agacgtggtg
 2301 gaccgaatat tggcaggcca cctggattcc cgagtgggag ttcgtgaata
 2351 cacctcctct ggtgaagctg tggatcaccg tcgagaagga gcccatcgtg
 2401 ggcgaggaga cattctacgt ggacggcgcg gccaacccgc aaacaaagct
 2451 cgggaaggcc gggtagctca ccaaccgggg ccgccagaag gtcgtcacc
 2501 tgaccgacac caccaaccag aagacggagc tgcaggccat ctatctcgt
 2551 ctccaggact ccggcctgga ggtgaacatc gtgacggaca gccagtagc
 2601 gctgggcatt attcaggccc agccggacca gtccgagagc gaactggtga
 2651 accagattat cgagcagctg atcaagaaag agaaggtcta cctcgtggt
 2701 gtcccggccc ataagggcat tggcggcaac gagcaggtcg acaagctgg
 2751 gagtgcgggg attagaaagg tgctgatggt gggttttcca gtcacacctc
 2801 aggtaccttt aagaaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac
 2851 tttttaaaag aaaagggggg actggaaggg ctaattcact cccaagaag

ES 2 744 676 T3

2901 acaagatata cttgatctgt ggatctacca cacacaaggc tacttcctg
 2951 attggcagaa ctacacacca gggccagggg tcagatatcc actgaccttt
 3001 ggatggtgct acaagctagt accagttgag ccagataagg tagaagaggc
 3051 caataaagga gagaacacca gcttggtaca ccctgtgagc ctgcatggga
 3101 tggatgacct ggagagagaa gtgtagtagt ggaggttga cagccgccta
 3151 gcatttcata acgtggcccg agagctgcat ccggagtact tcaagaactg
 3201 ctga

SEQ ID No 2:

1 MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKKYK LKHIVWASRE LERFAVNPLG
 51 LETSEGCRQI LGQLQPSLQT GSEELRSLYN TVATLYCVHQ RIEIKDTKEA
 101 LDKIEEEQNK SKKKAQAAA DTGHSNQVSQ NYPIVQNIQO QMVHQAI SPR
 151 TLNAWVKVVE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNMTLNT VGGHQAMQM
 201 LKETINEEAA EWDRVHPVHA GPIAPGQMRG PRGSDIAGTT STLQEQIGWM
 251 TNNPPIPVGE IYKRWIILGL NKIVRMYSPT SILDIRQGP K EPFRDYVDRF
 301 YKTLRAEQAS QEVKNWMTET LLVQANPDC KTILKALGPA ATLEEMMTAC
 351 QVGGPGHKA RVLMPISPI ETVPVKLPG MDGPKVKQWP LTEEKIKALV
 401 EICTEMEKEG KISKIGPENP YNTPVFAIKK KDSTKWRKLV DFRELNKRTQ
 451 DFWEVQLGIP HPAGLKKKKS VTVLDVGDAY FSVPLDEDFR KYTAFTIPSI
 501 NNETPGIRYQ YNVLPQGWKG SPAIFQSSMT KILEPFRKQN PDIVIQYMD
 551 DLYVGSLEI QHRTKIEEL RQHLLRWGLT TPKKHQKEP PFLKMGYELH
 601 PDKWTVQPIV LPEKDSWTVN DIQKLVGKLN WASQIYPGIK VRQLCKLLRG
 651 TKALTEVIPL TEEAELELAE NREILKEPVH GVYYDPSKDL IAEIQKQGG
 701 QWTYQIQEP FKNLKTGKYA RMRGAHTNDV KQLTEAVQKI TTESIWIWGK
 751 TPKFKLP IQK ETWETWWTEY WQATWIPEWE FVNTPLVKL WYQLEKEPIV
 801 GAETFYVDGA ANRETKLGA GYVTNRGRQK VVTLTDTTNQ KTELQAIYLA
 851 LQDSGLEVNI VTDSQYALGI IQAQPQSES ELVNQIIEQL IKKEKVYLAW
 901 VPAHKGIGGN EQVDKLSAG IRKVLVGFV VTPQVPLRPM TYKAAVDLSH
 951 FLKEKGGLEG LIHSQRRQDI LDLWIYHTQG YFPDWQNYTP GPGVRYPLTF
 1001 GWCKLVPVE PDKVEEANKG ENTSLLLHPVS LHGMDDPERE VLEWRFD SRL
 1051 AFHHVARELH PEYFKNC

SEQ ID No 3:

1 atggccgcca gagccagcat cctgagcggg ggcaagctgg acgcctggga
 51 gaagatcaga ctgaggcctg gcggcaagaa gaagtaccgg ctgaagcacc
 101 tgggtgtggc cagcagagag ctggatcgct tcgcccctgaa tcctagcctg
 151 ctggagacca ccgagggctg ccagcagatc atgaaccagc tgcagcccgc
 201 cgtgaaaacc ggcaccgagg agatcaagag cctgttcaac accgtggcca
 251 ccctgtactg cgtgcaccag cggatcgacg tgaaggatac caaggaggcc
 301 ctggacaaga tcgaggagat ccagaacaag agcaagcaga aaaccagca
 351 ggccgctgcc gacaccggcg acagcagcaa agtgagccag aactacccca
 401 tcatccagaa tgcccagggc cagatgatcc accagaacct gagcccaga
 451 accctgaatg cctgggtgaa agtgatcgag gaaaaggcct tcagccccga
 501 agtgatccct atgttcagcg ccctgagcga gggcgccacc ccccaggacc
 551 tgaacgtgat gctgaacatt gtgggaggac accaggccgc catgcagatg
 601 ctgaaggaca ccatcaatga ggaggccgcc gagggggaca gactgcacc
 651 cgtgcaggcc ggaccatcc cccctggcca gatcagagag cccagaggca
 701 gcgacatcgc cggcaccacc tccaccctc aagaacagct gcagtggatg
 751 accggcaacc ctcccattcc tggggcaac atctacaagc gttggatcat
 801 cctgggctg aacaagattg tgcggatgta cagccccgtg tccatcctg
 851 atatcaagca gggcccaag gagccctca gagactacgt ggaccggttc
 901 ttcaaggccc tgagagccga gcaggccacc caggacgtga agggctggat
 951 gaccgagacc ctgctggtgc agaacgcca ccccgactgc aagagcatcc
 1001 tgaaggcctt gggcagcggc gccacactgg aggagatgat gaccgcctgc
 1051 cagggagtgg gcggaccgg ccacaaggcc agagtgtgag ccgaggccat
 1101 gagccaggcc cagcagacca acatcatgat gcagcggggc aactcagag
 1151 gccagaagcg gatcaagtgc ttcaactgag gcaaggaggc ccacctggcc
 1201 agaaactgca gagccccag gaagaagggc tgctggaagt gtggcaagga
 1251 agggcaccag atgaaggact gcaccgagag gcaggccaat ttccctgggca

ES 2 744 676 T3

1301 agatttgcc tagcagcaag ggcagaccg gcaatttccc ccagagcaga
 1351 cccgagccca ccgcccctcc cgcgagctg ttcggcatgg gcgagggcat
 1401 cgccagcctg cccaagcagg agcagaagga cagagagcag gtgccccccc
 1451 tgggtgccct gaagtccctg ttcggcaacg atcctctgag ccagggatcc
 1501 cccatcagcc ccatcgagac cgtgcccctg accctgaagc ccggcatgga
 1551 tggcccaaaa gtgaaacagt ggcccctgac cgaggagaag attaaggccc
 1601 tgaccgaaat ctgtaccgag atggagaagg agggcaagat cagcaagatc
 1651 ggccccgaga acccctaaa cacccccac ttcgcatca agaagaagga
 1701 cagcaccaaag tggcggaaac tgggtggactt ccgggagctg aacaagagga
 1751 cccaggactt ctgggaagtg cagctgggca tcccccaacc tgcggcctg
 1801 aagaagaaga agtccgtgac agtgctggat gtgggagacg cctacttcag
 1851 cgtgcccctg gacgagaact tcaggaagta caccgccttc accatccccca
 1901 gcaccaaaaa cgagaccccc ggagtgagat accagtacaa cgtgctgcct
 1951 cagggctgga agggcagccc cgccatcttc cagagcagca tgaccaagat
 2001 cctggagccc ttccggagca agaaccccga gatcatcctc taccagtaca
 2051 ttgcccctt gtatgtgggc agcagctctg agatcggcca gcacaggacc
 2101 aagatcgaag agctgagggc ccacctgctg agctggggct tcaccacccc
 2151 cgataagaag caccagaagg agccccctt cctgtggatg ggctacgagc
 2201 tgcaccccga taagtggacc gtgcagccca tcatgctgcc cgataaggag
 2251 agctggaccg tgaacgacat ccagaaactg gtgggcaagc tgaattgggc
 2301 cagccaaatc tacgccggca ttaaagtga gcagctgtgc aggtgctga
 2351 gaggcgccaa agccctgaca gacatcgtga cactgacaga ggaggccgag
 2401 ctggagctgg ccgagaacag ggagatcctg aaggaccccg tgcacggcgt
 2451 gtactacgac cccagcaagg acctggtggc cgagattcag aagcagggcc
 2501 aggaccagtg gacctaccaa atctaccagg agcctttcaa gaacctgaaa
 2551 accgggaagt acgccagaa gagaagcgcc cacaccaacg atgtgaggca
 2601 gctggccgaa gtggtgcaga aagtggctat ggagagcatc gtgatctggg
 2651 gcaagacccc caagttcaag ctgcccctcc agaaggagac ctgggaaacc
 2701 tgggtgatgg actactggca ggccacctgg atcctctgag gggagtctgt
 2751 gaacaccccc cctctggtga agctgtggtg tcagctggag aaggaccccc
 2801 tcctgggccc cgagaccttc tacgtggagc gagccgccc a tagagagacc
 2851 aagetgggca aggcgggcta cgtgaccgac agaggcagac agaaagtggg
 2901 gtctctgacc gagacaacca accagaaaac cgagctgcac gccatcccgc
 2951 tggccctgca ggacagcggc agcgaagtga acatcgtgac cgactcccag
 3001 tacgccctgg gcatcattca ggcccagccc gatagaagcg agagcagcct
 3051 ggtgaaccag atcatcgaga agctgatcgg caaggacaaa atctacctga
 3101 gctgggtgcc cgcccacaag ggcacggcgc gcaacgagca ggtggacaag
 3151 ctggtgtcca gcggcatccg gaaagtgctg tttctggacg gcatcgacaa
 3201 ggcccaggag gaccacgaga gataccacag caactggcgg acaatggcca
 3251 gcgacttaa cctgcctccc atcgtggcca aggagatcgt ggccagctgc
 3301 gataagtgtc agctgaaggc cgaggccatg cacggccagg tggactgcag
 3351 cctggcctc tggcagctgg cctgcaccca cctggagggc aaagtgatcc
 3401 tgggtggcgt gcacgtggcc agcggctaca tcgaggccga agtgattccc
 3451 gccgagaccg gccaggagac cgccactctc ctgctgaagc tggccggcag
 3501 atggcccgtg aaagtgggtg acaccgccc aaggcagcaac ttcacctctg
 3551 ccgcccgtgaa ggcccctgt tgggtgggcca atateccagca ggagtccggc
 3601 atcccctaca accctcagag ccagggcgtg gtggccagca tgaacaagga
 3651 gctgaagaag atcatcggcc aggtgagggg ccaggccgag cacctgaaaa
 3701 cagccgtgca gatggccgtg ttcattccaca acttcaagcg gaagggcggc
 3751 attggcggct acagcggcgg agagcggatc atcgacatca tcgccaccga
 3801 tatccagacc aaggaactgc agaagcagat caccaagatt cagaacttca
 3851 gagtgtacta ccgggacagc agggaccccc tctggaaggg ccctgccaaag
 3901 ctgctgtgga agggcgaagg cgccgtggtg atccaggaca acagcagcat
 3951 caaagtgggtg ccccggagga aggcacaagat tctgcccggac tacggcaaac
 4001 agatggccgg cgatgactgc gtggccggca ggcaggatga ggacagatct
 4051 atgggcccga agtgggtccaa gggcagcatt gtgggctggc ccgagatccg
 4101 ggagagaatg agaagagccc ctgcccggc tcctggagtg ggccgctgt
 4151 ctcaggatct ggataagcac ggcgcatca ccagcagcaa catcaaac
 4201 cccagctgtg tgtggctgga ggcccaggaa gaggaggaag tgggctccc
 4251 tgtgagaccc caggtgcccc tgagacccat gacctacaag ggcgctctcg
 4301 acctgagcca cttcctgaag gagaagggcg gcctggacgg cctgatctac

ES 2 744 676 T3

4351 agccggaagc ggcaggagat cctggatctg tgggtgtacc acaccaggg
 4401 ctacttcccc gactggcaga attacacccc tggcctgga gtgcggtatc
 4451 ccctgacctt cggctggtgc ttcaagctgg tgccatgga gcccgacgaa
 4501 gtggagaagg ccacagaggg cgagaacaac agcctgctgc accctatctg
 4551 ccagcacggc atggacgatg aggagcggga agtgctgatc tggaaagtgc
 4601 acagcaggct ggcctgaag cacagagccc aggaactgca cccagagttc
 4651 tacaaggact gctga

SEQ ID No 4:

1 MAARASILSG GKLDWEKIR LRPGGKKKYR LKHLVWASRE LDRFALNPSL
 51 LETTEGCQOI MNQLQPAVKT GTEEIKSLFN TVATLYCVHQ RIDVKDTKEA
 101 LDKIEBIQNK SKQKTQAAA DTGDSSKVSQ NYPYIQNAQG QMIHQNLSPR
 151 TLNAWVKVIE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNVMLNI VGGHQAAMQM
 201 LKDTINEEAA EWDRLHPVQA GPIPPGQIRE PRGSDIAGTT STPQEQQLQWM
 251 TGNPPIPVGN IYKRWII LGL NKIVRMYSVP SILDIKQGPK EPFRDYVDRF
 301 FKALRAEQAT QDVKGWMTET LLVQNaNPDC KSILKALGSG ATLEEMMTAC
 351 QVGGPGHKA RVLAEAMSQA QQTNIMMQRG NFRGQKRIKC FNCCKEGHLA
 401 RNCRAPRKKG CWKCGKEGHQ MKDCTERQAN FLGKIWPSSK GRPGNFPQSR
 451 PEPTAPPAEL FGMGEGIASL PKQEQKDREQ VPPLVSLKSL FGNDPLSQGS
 501 PISPIETVPV TLKPGMDGPK VKQWPLTEEK IKALTEICTE MEKEGKISKI
 551 GPENPYNTPI FAIKKDKSTK WRKLVDFREL NKRTQDFWEV QLGIHPAGL
 601 KKKKSVTVLD VGDAYFSVPL DENFRKYTAF TIPSTNNETP GVRYQYNVLP
 651 QGWKSPAIF QSSMTKILEP FRSKNPEIII YQYMAALYVG SDLEIGQHRT
 701 KIBELRAHLL SWGFTTPDKK HQKEPPFLWM GYELHPDKWT VQPIMLPDKE
 751 SWTVNDIQKL VGKLNWASQI YAGIKVKQLC RLLRGAKALT DIVTLTEEAE
 801 LELAENREIL KDPVHGVIYD PSKDLVAETQ KQCQDQWYQ IYQEPFKNLK
 851 TGKYARKRSA HTNDVRLAE VVQKVAMESI VIWGKTPKFK LPIQKETWET
 901 WWM DYWQATW IPEWEFVNTPLV KLWYQLE KDPILGAETF YVDGAANRET
 951 KLGKAGYVTD RGRQKVVS LT ETTNQKTELH AILLALQDSQ SEVNI VTDSDQ
 1001 YALGIIQAQP DRSESELVNQ IIEKLI GKDK IYLSWVPAHK GIGGNEQVDK
 1051 LVSSGIRKVL FLDGIDKAQE DHERYHSNWR TMSDFNLPP IVAKEIVASC
 1101 DKCQLKGEAM HGQVDCSPGI WQLACTHLEG KVILVAVHVA SGYIEAEVIP
 1151 AETGQETAYF LLKLAGRWPV KVVHTANGSN FTSAAVKAAC WWANIQQEFG
 1201 IPYNPQSQGV VASMNKELKK IIGQVRDQAE HLKTAVQMAV FIHNFKRKGG
 1251 IGGYSAGERI IDIIATDIQT KELQKQITKI QNFRVYYRDS RDPIWKGPFAK
 1301 LLWKGEAVV IQDNSDIKVV PRRKAKILRD YGKQ MAGDDC VAGRQDEDRS
 1351 MGKWSKSGSI VGWPEIRERM RRAAAA PGV GAVSQDL DKH GAITSSNINN
 1401 PSCVWLEAQE EEEVGFVVRP QVPLRPMTYK GAFDL SHFLK EKGGLDGLIY
 1451 SRKRQEILDL WVYHTQGYFP DWQNYTPGPG VRYPLTFGWC FKLVPMEPDE
 1501 VEKATEGENN SLLHPICQHG MDDEEREVLI WKFDSRLALK HRAQELHPEF
 1551 YKDC

SEQ ID No 5:

1 atgagggtga tggagatcca gcggaactgc cagcacctgc tgagatgggg
 51 catcatgatc ctggcatga ttatcatctg cagcacccgc gacaacctgt
 101 gggtagaccgt gtactacggc gtgcctgtgt ggagagatgc cgagaccacc
 151 ctgttctgcg ccagcgacgc caaggcctac agcaccgaga agcacaatgt
 201 gtgggccacc cagcctgcg tgccctaccga tcccaaccct caggagatcc
 251 ccctggacaa cgtgaccgag gagttcaaca tgtggaagaa caacatgggt
 301 gaccagatgc acgaggacat catcagcctg tgggaccaga gcctgaagcc
 351 tgcgctgcag ctgacccccc tgtgcgtgac cctgaactgc agcaacgcca
 401 gactgaacgc caccttcaac tccaccgagg acagggagg catgaagaac
 451 tgcagcttca acatgaccac cgagctgctg gataagaagc agcaggtgta
 501 cagcctgttc taccggctgg acatcgagaa gatcaacagc agcaacaaca
 551 acagcgagta ccggctggtg aactgcaata ccagcgcct caccaggcc
 601 tgccctaagg tgacctcga gcccatcccc atccactact gcgcccctgc
 651 cggcttcgcc atcctgaagt gcaacgacac cgagttcaat ggcaccggcc
 701 cctgcaagaa tgtgagcacc gtgcagtgca cccaccgcat caagcccgtg
 751 gtgtccacc agctgctgct gaacggcagc ctggccgaga gagaagtgcg

ES 2 744 676 T3

801 gatcaggagc gagaacatcg ccaacaacgc caagaacatc atcgtgcagt
 851 tcgccagccc cgtgaagatc aactgcatcc ggcccaacaa caataaccgg
 901 aagagctaca gaatcggccc tggccagacc ttctacgcca ccgacattgt
 951 gggcgacatc agacaggccc actgcaacgt gtccaggacc gactggaaca
 1001 acaccctgag actggtggcc aaccagctgc ggaagtactt cagcaacaag
 1051 accatcatct tcaccaacag cagcggcgga gacctggaga tcaccaccca
 1101 cagcttcaat tgtggcgggc agttcttcta ctgcaacacc tccggcctgt
 1151 tcaatagcac ctggaccacc aacaacatgc aggagtccaa cgacaccagc
 1201 aacggcacca tcaccctgcc ctgccggatc aagcagatca tccggatgtg
 1251 gcagcgcgtg ggccaggcca tgtacgcccc tcccatcgag ggcgatgattc
 1301 gctgcgagag caacatcacc ggctgatcc tgaccagaga tggcggcaac
 1351 aacaattccg ccaacgagac cttcagacct ggcggcggag atatccggga
 1401 caactggcgg agcgagctgt acaagtacaa ggtggtgaa atcgagcccc
 1451 tgggctggc ccccaccaga gccaaagaaa gagtgggtga ggggagaaag
 1501 agagccgtgg gcatcggcgc cgtgtttctg ggcttccctg gagccgcggg
 1551 atctacaatg ggagccgcca gcatcaccct gaccgtgcag gccagacagc
 1601 tctgagcgg catcgtgcag cagcagagca atctgctgag agccatcgag
 1651 gccagcagc agctgctgaa gctgacagtg tggggcatca agcagctgca
 1701 ggccaggggtg ctggccgtgg agagatacct gagggaccag cagctcctgg
 1751 gcatctgggg ctgcagcggc aagctgatct gcaccaccaa cgtgccctgg
 1801 aatagcagct ggagcaacaa gagctacgac gacatctggc agaacatgac
 1851 ctggctgcag tgggacaagg agatcagcaa ctacaccgac atcatctaca
 1901 gcctgatcga ggagagccag aaccagcagg agaagaacga gcaggatctg
 1951 ctggccctgg acaagtgggc caacctgtgg aactggttcg acatcagcaa
 2001 gtggctgtgg tacatcagat cttga

SEQ ID No 6:

1 MRVMEIQRNC QHLLRWGIMI LGMIIICSTA DNLWVTVYYG VPVWRDAETT
 51 LFCASDAKAY STEKHNWVAT HACVPTDNP QEIPLDNVTE EFNMWKNNMV
 101 DQMHEDIISL WDQSLKPCVQ LTPLCVTLNC SNARVNATFN STEDREGMKN
 151 CSFNMTTELK DKKQQVYSLF YRLDIEKINS SNNNSEYRLV NCNTSAITQA
 201 CPKVTFEPIP IHYCAPAGFA ILKCNDFEFN GTGPCKNVST VQCTHGKIPV
 251 VSTQLLLNGS LAEREVRIRS ENIANNAKNI IVQFASPVKI NCIRPNNNTR
 301 KSYRIGPGQT FYATDIVGDI RQAHCNVSRT DWNNTLRLVA NQLRKYFSNK
 351 TIIFTNSSGG DLEITHSFN CGGEFFCNT SGLFNSTWTT NNMQESNDTS
 401 NGTITLPCRI KQIIRMWQRV GQAMYAPPIE GVIRCESNIT GLILTRDGGN
 451 NNSANETFRP GGGDIRDNRW SELYKYKVVK IEPLGVAPTR AKRRVVEREK
 501 RAVGIGAVFL GFLGAAGSTM GAASITLVQ ARQLLSGIVQ QQSNLLRAIE
 551 AQQQLLKLTV WGIKQLQARV LAVERYLRDQ QLLGIWGCSSG KLICTTNVPW
 601 NSSWSNKSVD DIWQNMTWLQ WDKEISNYTD IIYSLIEESQ NQOEKNEQDL
 651 LALDKWANLW NWFDISKWLW YIRS

SEQ ID No 7:

atgaaagtga aggagaccag gaagaattat cagcacttgt ggagatgggg 50
 caccatgctc cttgggatgt tgatgatctg tagtgctgca gaacaattgt 100
 gggtcacagt ctattatggg gtacctgtgt ggaaagaagc aactaccact 150
 ctattctgtg catcagatgc taaagcatat gatacagagg tacataatgt 200
 ttgggccaca catgcctgtg taccacaga ccccaaccca caagaagtag 250
 tattgggaaa tgtgacagaa tattttaaca tgtggaaaaa taacatggta 300
 gaccagatgc atgaggatat aatcagttta tgggatcaaa gcttgaagcc 350
 atgtgtaaaa ttaacccac tctgtgttac tttagattgc gatgatgtga 400
 atacactaa tagtactact accactagta atggttggac aggagaaata 450
 aggaaaggag aaataaaaaa ctgctctttt aatatcacca caagcataag 500
 agataagggt caaaaagaat atgcactttt ttataacctt gatgtagtac 550
 caatagatga tgataatgct actacaaaa ataaaactac tagaaacttt 600
 aggttgatac attgtaactc ctcagtcatg acacaggcct gtccaaaggt 650
 atcatttgaa ccaattccca tacattattg tgccccggct ggttttgcca 700
 ttctgaagtg taacaataag acgtttgatg gaaaaggact atgtacaaat 750
 gtcagcacag tacaatgtac acatggaatt aggccagtag tgtcaactca 800

ES 2 744 676 T3

actgctgta	aatggcagtc	tagcagaaga	agaggtagta	attagatctg	850
acaatttcat	ggacaatact	aaaaccataa	tagtacagct	gaatgaatct	900
gtagcaatta	attgtacaag	acccaacaac	aatacaagaa	aaggtataca	950
tataggacca	gggagagcct	tttatgcagc	aagaaaaata	ataggagata	1000
taagacaagc	acattgtaac	cttagtagag	cacaatggaa	taacacttta	1050
aaacagatag	ttataaaatt	aagagaacac	tttgggaata	aaacaataaa	1100
atttaataca	tcctcaggag	gggaccaga	aattgtaagg	catagtttta	1150
attgtggagg	ggaatttttc	tactgtgata	caacacaact	gtttaatagt	1200
acttggaaatg	gtactgaagg	aaataaact	gaaggaaata	gcacaatcac	1250
actcccatgt	agaataaaac	aaattataaa	catgtggcag	gaagtaggaa	1300
aagcaatgta	tgccccctcc	atcggaggac	aaattagatg	ttcatcaaat	1350
attacagggc	tgctattaac	aagagatggt	ggtaccgaag	ggaatgggac	1400
agagaatgag	acagagatct	tcagacctgg	aggaggagat	atgagggaca	1450
attggagaag	tgaattatat	aaatataaag	tagtaaaagt	tgaaccacta	1500
ggagtagcac	ccaccagggc	aaagagaaga	gtggtgcaga	gataa	1545

SEQ ID No 8:

MKVKETRKNY	QHLWRWGTM	LGMLMICSAA	EQLWVTVYYG	VPVWKEATTT	50
LFCASDAKAY	DTEVHNWVAT	HACVPTDNP	QEVVLGNVTE	YFNMWKNM	100
DQMHEDIISL	WDQSLKPCVK	LTPLCVTLDC	DDVNTNST	TTSNGWTGEI	150
RKGEIKNCSF	NITTSIRDKV	QKEYALFYNL	DVVPIDDDNA	TTKNKTRNF	200
RLIHCNSSVM	TQACPKVSFE	PIPIHYCAPA	GFAILKCNK	TFDGKGLCTN	250
VSTVQCTHGI	RPVVSTQLLL	NGSLAEEVV	IRSDNFMNT	KTIIVQLNES	300
VAINCTRPNN	NTRKGIHIGP	GRAFYAARKI	IGDIRQAHCN	LSRAQWNNTL	350
KQIVIKLREH	FGNKTIKFNQ	SSGDPPIVR	HSFNCGGEFF	YCDTTQLFNS	400
TWNGTEGNT	EGNSTITLPC	RIKQIINMWQ	EVGKAMYAPP	IGGQIRCSSN	450
ITGLLLTRDG	GTEGNGTENE	TEIFRPGGGD	MRDNWRSELY	KYKVVKVEPL	500
GVAPTRAKRR	VVQR				514

SEQ ID No 9:

atgcatcaca	eggccgcgtc	cgataacttc	cagctgtccc	agggtgggca	gggattcgcc	60
attccgatcg	ggcaggcgat	ggcgatcgcg	ggccagatcc	gatcgggtgg	ggggatcacc	120
accgttcata	tcgggectac	cgccttctc	ggcttgggtg	ttgtcgacaa	caacggcaac	180
ggcgcaacgag	tccaacgcgt	ggtcgggagc	gctccggcgg	caagtctcgg	catctccacc	240
ggcgacgtga	tcaccgcggt	cgacggcgct	ccgatcaact	cggccaccgc	gatggcggac	300
gcgcttaacg	ggcatcatcc	cggtgacgtc	atctcgggtg	cctggcaaac	caagtccggc	360
ggcacgcgta	cagggaaagt	gacattggcc	gagggacccc	cggccgaatt	catggtggat	420
ttcggggcgt	taccaccgga	gatcaactcc	gcgaggatgt	acgccggccc	gggttcggcc	480
tcgctgggtg	ccgcggctca	gatgtgggac	agcgtggcga	gtgacctggt	ttcggcccgcg	540
tcggcgtttc	agtccgtggt	ctggggctcg	acgggtgggt	cgtggatagg	ttcgtcggcg	600
ggtctgatgg	tggcgggcgc	ctcgccgat	gtggcggtga	tgagcgctac	cgcggggcag	660
gccgagctga	ccgccgcca	ggtccgggt	gctcggcggg	cctacgagac	ggcgtatggg	720
ctgacgggtg	ccccgcggg	gatcgccgag	aaccgtgctg	aactgatgat	tctgatagcg	780
accaacctct	tggggcaaaa	caccccgcg	atcgcgggtc	acgaggccga	atacggcgag	840
atgtgggccc	aagacgcgc	cgcgatgttt	ggctacgcgc	cggcgacggc	gacggcgacg	900
gcgacgttgc	tgccgttcga	ggaggcgccg	gagatgacca	gcgcggtggg	gctcctcgag	960
caggccgcgc	cggtcgagga	ggcctccgac	accgcgcggg	cgaaccagtt	gatgaacaat	1020
gtgccccagg	cgetgcaaca	gctggcccag	cccacgcagg	gcaccacgcc	ttcttccaag	1080
ctgggtggcc	tgtggaagac	ggtctcgccg	catcgggtgc	cgatcagcaa	catggtgtcg	1140
atggccaaca	accacatgtc	gatgaccaac	tcgggtgtgt	cgatgaccaa	cacctgagc	1200
tcgatgttga	agggtttg	tcggcgggcg	ggcgcccagg	ccgtgcaaac	cgcggcgcaa	1260
aacggggtcc	ggcgatgag	ctcgctgggc	agctcgtg	gttcttcggg	tctggcggt	1320
ggggtggccg	ccaactggg	tcggcgggcc	tcggctcgggt	cggtgtcggg	gccgcaggcc	1380
tggccgcggg	ccaaccaggc	agtcaccctg	gcggcgccgg	cgctgccgct	gaccagcctg	1440
accagcgccg	cgaaaagagg	gcccgggcag	atgctgggcg	ggctgccggt	gggcagatg	1500
ggcgccaggg	ccggtgggtg	gctcagtggt	gtgctgctg	ttccgcgcgc	acctatgtg	1560
atgcccattt	ctccggcagc	cgggcatatc	gccccgcggg	ccttgtcgca	ggaccggttc	1620
gccgacttcc	ccgcgctgcc	cctcgaccgc	tcgcgatgg	tcgccaagt	ggggccacag	1680
gtggtcaaca	tcaacaccaa	actgggctac	aacaacgcgc	tggcgccggg	gaccggcatc	1740

ES 2 744 676 T3

gtcatcgatc ccaacggtgt cgtgctgacc aacaaccacg tgatcgcggg cgccaccgac 1800
atcaatgcgt tcagcgtcgg ctccggccaa acctacggcg tcgatgtggt cgggtatgac 1860
cgcaccagg atgtcgcggt gctgcagctg cgcggtgccg gtggcctgcc gtcggcgcg 1920
atcggtgcg gcgtcgcggt tggtagccc gtcgctcgcga tgggcaacag cggtgggcag 1980
ggcggaacgc cccgtgcggt gcctggcagg gtggctcgcgc tcggccaaac cgtgcaggcg 2040
tcggattcgc tgaccggtgc cgaagagaca ttgaacgggt tgatccagtt cgatgcccg 2100
atccagcccg gtgatgcggg cgggcccgtc gtcaacggcc taggacaggt ggtcggtatg 2160
aacacggccg cgtcctag 2178

SEQ ID No 10:

MHHTAASDNF QLSQGGQGF A IPIGQAMAIA GQIRSGGGSP TVHIGPTAFL GLGVVDNNGN 60
GARVQRVVG S APAASLG I ST GDVITAVDGA PINSATAMAD ALNGHHPGDV ISVTWQTKSG 120
GTRTGNVTLA EGPPAEFMVD FGALPPEINS ARMYAGPGSA SLVAAAQMW D SVASDLFSAA 180
SAFQSVVWGL TVGSWIGSSA GLMVAASPY VAWMSVTAGQ AELTAAQVRV AAAAYETAYG 240
LTVPPPVI A E NRAELMILIA TNLLGQNTPA IAVNEAEYGE MWAQDAAAMF GYAAATATAT 300
ATLLPFEEAP EMTSAGGLE QAAAVEEASD TAAANQLMNN VPQALQQLAQ PTQGTTPSSK 360
LGGLWKT V SP HRSPI SNMVS MANNHMSMTN SGVSMTNTLS SMLKGFAPAA AAQAVQTAAQ 420
NGVRAMSSLG SSLGSSGLGG GVAANLGRAA SVGSLSVPQA WAAANQAVTP AARALPLTSL 480
TSAAERGPQ MGLGLPVGQM GARAGGGLSG VLRVPPRPYV MPHSPAAGDI APPALSQDRF 540
ADFPALPLDP SAMVAQVGPQ VVNINTKLG Y NNAVAGAGTGI VIDPNGVVL T NNHVIAGATD 600
INAFSVGSGQ TYGVDVVG Y D RTQDVAVLQL RGAGGLPSAA IGGGVAVGEP VVAMGNSGGQ 660
GGTPRAVPGR VVALGQTVQA SDSLTGA EET LNGLIQFDA A IQPGDAGGPV VNLGLQVVGM 720
NTAAS 725

SEQ ID No 11:

atgatgagaa aacttgccat cctcagcgtc agctctttcc tgttcgtgga 50
ggccctcttc caggagtatc agtgctacgg aagcagcagc aatacaagg 100
tcttgaacga gctcaactat gacaacgctg gaacgaacct gtataacgag 150
ctggagatga actactatgg caagcaggag aactggtata gcctgaagaa 200
gaacagccgg tccttggggc agaacgacga cggcaacaac aacaacggcg 250
acaacggcag ggagggcaaa gatgaggaca agagggacgg gaacaacgag 300
gataacgaga agctgcggaa gcccaagcac aagaaactca agcagcccgc 350
cgacgggaac ccggacccca atgcaaatcc caacgtcgac ccaaacgcaa 400
accctaactg ggaccccaac gccaatccca acgtcgatcc taatgccaat 450
ccaaatgcc a accctaactg a aatccta at gcaaacccca acgccaatcc 500
taacgccaa c ccaa atgcc a acccaaacgc taaccccaac gctaacc caa 550
atgcaaatcc caatgctaac ccaaacgtgg accctaactg taaccccaac 600
gcaaacccca acgccaatcc taacgcaaac ccaatgcaa acccaaacgc 650
aaatcccaac gctaacccta acgcaaaccc caacgccaac ccta atgcc a 700
accccaatgc taaccccaac gccaatccca acgcaaatcc aaacgccaac 750
ccaaatgcaa accccaacgc taatcccaac gccaacccca acgccaatcc 800
taacaagaac aatcagggca acgggcaggg ccataacatg ccgaacgacc 850
ctaactcggaa tgtggacgag aacgccaacg ccaacagcgc cgtgaagaac 900
aacaacaacg agggagccctc cgacaagcac atcaaggaat acctgaacaa 950
gatccagaac agtctgagca ccgagtggtc cccctgctcc gtgacctgcg 1000
gcaacggcat ccaggtgagg atcaagccc gctccgcaa caagcccaag 1050
gacgagctgg actacgcaa cgacatcgag aagaagatct gcaagatgga 1100
gaaatgcagct ctgtgttcaac gtcgtgaa ctcgcccac ggctgtga 1149

5

SEQ ID No 12:

MMRKLAILSV SSFLFVEALF QEYQCYGSSS NTRVLNELNY DNAGTNLYNE 50
LEMNYYGKQE NWYSLKKN SR SLGENDDGNN NNGDNGREGK DEDKRDGNNE 100
DNEKLRKPKH KKLKQPADGN PDPNANPNVD PNANPNVDPN ANPNVDPNAN 150
PNANPNANPN ANPNANPNAN PNANPNANPN ANPNANPNAN PNVDPNANPN 200
ANPNANPNAN PNANPNANPN ANPNANPNAN PNANPNANPN ANPNANPNAN 250
PNANPNANPN ANPNANPNKN NQNGCQHNM PNDPNRNVDE NANANSVKN 300
NNNEE PSDKH IKEYLNKIQN SLSTEWSPCS VTCGNGIQVR IKPGSANKPK 350
DEL DYANDIE KKICKMEKCS SVFN VVNSAI GL 382

ES 2 744 676 T3

SEQ ID No 13:

atgatggctc	ccgatcctaa	tgcaaatcca	aatgcaaacc	caaacgcaaa	50
ccccaatgca	aatcctaata	caaaccceca	tgcaaatcct	aatgcaaate	100
ctaattgcaa	tccaaatgca	aatccaaatg	caaaccceca	cgcaaacccc	150
aatgcaaate	ctaattgcaa	tccaaatgca	aatccaaatg	caaaccceca	200
tgcaaaccca	aatgcaaacc	ccaatgcaaa	tcctaataaa	aacaatcaag	250
gtaattggaca	aggtcacaat	atgccaaatg	acccaaaccg	aatgtatgat	300
gaaaatgcta	atgccaacag	tgctgtaaaa	aataataata	acgaagaacc	350
aagtgataag	cacataaaag	aatattttaa	caaaatataa	aattctcttt	400
caactgaatg	gtcccatatg	agtgttaact	gtggaaatgg	tattcaagtt	450
agaataaagc	ctggctctgc	taataaacct	aaagacgaat	tagattatgc	500
aaatgatatt	gaaaaaaaaa	tttgtaaaat	ggaaaaatgt	tccagtgtgt	550
taattgtcgt	aaatagttca	ataggattag	ggcctgtgac	gaacatggag	600
aacatcacat	caggattcct	aggaccctg	ctcgtgttac	aggcggggtt	650
tttcttggtg	acaagaatcc	tcacaatacc	gcagagtcta	gactcgtggt	700
ggactttctc	caattttcta	gggggatcac	ccgtgtgtct	tgcccaaaat	750
tcgcagtccc	caacctccaa	tcactacca	acctcctgtc	ctccaatttg	800
tctctggtat	cgctggatgt	gtctgcggcg	ttttatcata	ttctcttca	850
tctctgtctc	atgcctcctc	ttcttattgg	ttcttctgga	ttatcaaggt	900
atgttgcccc	tttgcctctc	aattccagga	tcaacaacaa	ccaatacggg	950
accatgcaaa	acctgcaaga	ctcctgtcca	aggcaactct	atgtttccct	1000
catgttgctg	tacaaaaact	acggatggaa	attgcacctg	tattcccatc	1050
ccatcgtcct	gggctttcgc	aaaataccta	tgggagtggg	cctcagtccg	1100
tttctcttgg	ctcagtttac	tagtgccatt	tgttcagtgg	ttcgtagggc	1150
tttccccac	tgtttgctt	tcagctatat	ggatgatgtg	gtattggggg	1200
ccaagtctgt	acagcatcgt	gagtccttt	ataccgctgt	taccaatttt	1250
cttttgtctc	tgggtataca	ttaa			1275

SEQ ID No 14:

MMAPDPNANP	NANPNANPNA	NPANPNANP	NANPNANPNA	NPANPNANP	50
NANPNANPNA	NPANPNANP	NANPNANPNK	NNQNGQGHN	MPNDPNRNV	100
ENANANSAVK	NNNNEEPSDK	HIKEYLNKIQ	NSLSTEWSPC	SVTCNGIQV	150
RIKPGSANKP	KDELDYANDI	EKKICKMEKC	SSVFNVNSS	IGLGPVTNME	200
SQSPGFLNGL	LVLQAGFFLL	TRILTIPQSL	DSWWTSLNFL	GGSPVCLGQN	250
SQSPTSINHSP	TSCPPICPGY	RWMCLRRFII	FLFILLLCLI	FLLVLLDYQQ	300
MLPVCPLIPG	STTTNTGPKC	TCTTPAQGNS	MFPSCCTKP	TDGNCTCPI	350
PSSWAFAYKL	WEWASVRFWS	LSELLVPFVQW	FVGLSPTVWL	SAIWMWYWG	400
PSLYSIVSPF	IPLLPPIFFCL	WVYI			424

5

SEQ ID No 15:

atggtcattg	ttcagaacat	acagggccaa	atgggccacc	aggcaattag	50
tccgcgaact	cttaatgcat	gggtgaaggt	cgtggaggaa	aaggcattct	100
ccccggaggt	cattccgatg	ttttctgcgc	tatctgaggg	cgcaacgccg	150
caagacctta	ataccatgct	taaacaggta	ggcgggcacc	aagccgctat	200
gcaaagctta	aaagagacta	taaacgaaga	ggccgccgaa	tgggatcgag	250
tgcaaccggg	gcacgccggc	ccaattgcac	caggccagat	gcgcgagccg	300
cgccgggtctg	atattgcagg	aactacgtct	accttcagg	agcagattgg	350
gtggatgact	aacaatccac	caatccgggt	cggagagatc	tataagaggt	400
ggatcactact	gggactaaac	aagatagtcc	gcatgtatcc	tccgacttct	450
atactggata	tacgccaaag	cccaaaggag	ccgttcaggg	actatgtcga	500
ccgattctat	aagacccttc	gcgcagagca	ggcatcccag	gaggtcaaaa	550
attggatgac	agaaactctt	ttgggtcaga	atgcgaatcc	ggattgtaaa	600
acaattttaa	aggctctagg	accggccgca	acgctagaag	agatgatgac	650
ggcttctcag	ggagtccgtg	gaccggggca	taaagcccgc	gtcttacaca	700
tgggcccgat	atctccgata	gaaacagttt	cggccaagct	taaaccaggg	750
atggatggtc	caaaggctaa	gcagtgcccg	ctaaccggaag	agaagattaa	800
ggcgcctcgt	gagatttgta	ctgaaatgga	gaaggaaggc	aagataagca	850
agatcggggc	agagaaccog	tacaatacac	cggatattgc	aataaagaaa	900

ES 2 744 676 T3

aaggattcaa caaaatggcg aaagcttgta gattttaggg aactaaacaa 950
 gcgaacccaa gacttttggg aagccaact agggatccca catccagccg 1000
 gtctaaagaa gaagaaatcg gtcacagtc tggatgtagg agacgcatat 1050
 tttagtgtac cgcttgatga ggacttccga aagtatactg cgtttactat 1100
 accgagcata aacaatgaaa cgccaggcat tcgctatcag tacaacgtgc 1150
 tcccgcaggg ctggaagggg tctccggcga tatttcagag ctgtatgaca 1200
 aaaatacttg aaccattccg aaagcagaat ccggatattg taatttacca 1250
 atacatggac gatctctatg tgggctcggg tctagaaatt gggcagcatc 1300
 gcaactaagat tgaggaactg aggcaacatc tgcttcgatg gggcctcact 1350
 actcccagaca agaagcacca gaaggagccg ccgttcctaa agatgggcta 1400
 cgagcttcat ccggacaagt ggacagtaca gccgatagtg ctgcccgaaa 1450
 aggattcttg gaccgtaaat gatattcaga aactagtcgg caagcttaac 1500
 tgggcctctc agatttaccc aggcattaag gtccgacagc tttgcaagct 1550
 actgagggga actaaggctc taacagaggt catcccatta acggaggaag 1600
 cagagcttga gctggcagag aatcgcgaaa ttcttaagga gccggtgac 1650
 ggggtatact acgacccctc caaggacctt atagccgaga tccagaagca 1700
 ggggcagggc caatggacgt accgatata tcaagaaccg tttagaatc 1750
 tgaagactgg gaagtacgcg cgcatgaggg gggctcatac taatgatgta 1800
 aagcaactta cggaaagcagt acaaagatt actactgagt ctattgtgat 1850
 atggggcaag accccaaagt tcaagctgcc catacagaag gaaacatggg 1900
 aaacatgggt gactgaatat tggcaagcta cctggattcc agaatgggaa 1950
 tttgtcaaca cgccgccact tgttaagctt tggtagcagc ttgaaaagga 2000
 gccgatagta ggggcagaga ccttctatgt cgatggcggc gccaatcgcg 2050
 aaacgaagct aggcaaggcg ggatacgtga ctaatagggg ccgccaaaag 2100
 gtcgtaacc ttagcgatc caccaatcag aagactgaac tacaagcgat 2150
 ttaccttgca cttcaggata gtggcctaga ggtcaacata gtcacggact 2200
 ctcaatatgc gcttggcatt attcaagcgc agccagatca aagcgaaagc 2250
 gagcttghtaa accaaataat agaacagctt ataaagaaag agaaggtata 2300
 tctggcctgg gtccccgctc acaaggggat tggcggcaat gagcaagtgg 2350
 acaagctagt cagcgtgagg attcgcgaagg ttcttgcgat ggggggtaag 2400
 tgggtctaagt ctagcgtagt cggctggccg acagtcccgcg agcgcagtcg 2450
 acgcgcccga ccagccgcag atggcgtggg ggcagcgtct agggatctgg 2500
 agaagcagaa ggctataact tccagtaaca cggcggcgac gaacgcgcga 2550
 tgcgcatggt tagaagccca agaagaggaa gaagtagggt tcccggtaac 2600
 tcccaggtg ccgttaaggc cgatgacctc taaggcagcg gtggatcttt 2650
 ctcaacttct taaggagaaa ggggggctgg agggcttaat tcacagccag 2700
 aggcgacag atattcttga tctgtggatt taccatacc aggggtactt 2750
 tccggactgg cagaattaca cccgggggccc aggcgtgccc tatcccctga 2800
 ctttcgggtg gtgctacaaa ctagtcccag tggaaaccga caaggtcgaa 2850
 gaggctaata agggcgagaa cacttctctt cttcaccgg taagcctgca 2900
 cgggatggt gacccagaac gagaggtctc agaatggagg ttcgactctc 2950
 gacttgcggt ccatcacgta gcacgcgagc tgcattcaga atatttcaag 3000
 aactgccgcc caatgggccc cagggccagt gtacttagtg gcgagaaact 3050
 agatcgatgg gaaaagatac gctacgccc ggggggcaag aagaagtaca 3100
 agcttaagca cattgtgtgg gcctctcgcg aacttgagcg attcgcagtg 3150
 aatccaggcc tgcttgagac gagtgaaggc tgtaggcaaa ttctggggca 3200
 gctacagccg agcctacaga ctggcagcga ggagcttcgt agtctttata 3250
 ataccgtcgc gactctctac tgcgttcac aacgaattga aataaaggat 3300
 actaaagagg cccttgataa aattgaggag gaacagaata agtcgaaaaa 3350
 gaaggcccag cagggccgccc ccgacaccgg gcacagcaac caggtgtccc 3400
 aaaactacta a 3411

SEQ ID No 16:

MVIVQNIQQQ MVHQAISPRT LNAWKVVEE KAFSPEVIPM FSALSEGATP 50
 QDLNNTMLNTV GGHQAAMQML KETINEEAAE WDRVHPVHAG PIAPGQMRP 100
 RGSDIAGTTS TLQEQIGWMT NNPPIPVGEI YKRWIILGLN KIVRMYSPTS 150
 ILDIRQGPKE PFRDYVDRFY KTLRAEQASQ EVKNWMTETL LVQNPANPDCK 200
 TILKALGPAA TLEEMMTACQ GVGPGHKAR VLHMGPISPI ETVSVKLPKPG 250
 MDGPKVKQWP LTEEKIKALV EICTEMEKEG KISKIGPENP YNTPVFAIKK 300
 KDSTKWRKLV DFRELNKRTQ DFWEVQLGIP HPAGLKKKKS VTVLDVGDAY 350

ES 2 744 676 T3

FSVPLDEDFR	KYTAFTIPSI	NNETPGIRYQ	YNVLPQGKKG	SPAIFQSCMT	400
KILEFFRKQN	PDIVIIYQYMD	DLYVGSLEI	GQHRTKIEEL	RQHLLRWGLT	450
TPDKKHQKEP	PFLKMGYELH	PDKWTVQPIV	LPEKDSWTVN	DIQKLVGKLN	500
WASQIYPGIK	VRQLCKLLRG	TKALTEVIPL	TEEALELAE	NREILKEPVH	550
GVYYDPSKDL	IABIQKQGQG	QWYQIYQEP	FKNLKTGKYA	RMRGAHTNDV	600
KQLTEAVQKI	TTESIVIWGK	TPKFKLPIQK	ETWETWTEY	WQATWIPEWE	650
FVNTFPPLVKL	WYQLEKEPIV	GAETFYVDGA	ANRETKLGKA	GYVTNRGRQK	700
VVTLTDTTNQ	KTELQAIYLA	LQDSGLEVNI	VTDSQYALGI	IQAQPDQSES	750
ELVNQIIEQL	IKKEKVYLAW	VPAHKGIGGN	EQVDKLVSAG	IRKVLAMGK	800
WSKSSVVGWP	TVRERMRAE	PAADGVGAAS	RDLEKHGAIT	SSNTAATNAA	850
CAWLEAQEEE	EVGFVPVTPQV	PLRPMTYKAA	VDLSHFLKEK	GGLEGLIHSQ	900
RRQDILDLWI	YHTQGYFPDW	QNYTPGPGVR	YPLTFGWCYK	LVPVEPKVE	950
EANKGENTSL	LHPVSLHGMD	DPEREVLEWR	FDSRLAFHHV	ARELHPEYFK	1000
NCRPMGARAS	VLSGGELDRW	EKIRLRPGGK	KKYKLKHIVW	ASRELERFAV	1050
NPGLLETSEG	CRQILGQLQP	SLQTGSEELR	SLYNTVATLY	CVHQRIEIKD	1100
TKEALDKIEE	EQNKSKKKAQ	QAAADTGHSN	QVSQNY		1136

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> GlaxoSmithKline Biologicals S.A. VOSS, Gerald Hermann
- <120> Procedimiento novedoso y composiciones
- 5 <130>VB62209
- <160> 16
- <170> FastSEQ fo Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 3204
- 10 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> VIH
- 15 <400> 1

ES 2 744 676 T3

atgggtgccc	gagcttcggt	actgtctggt	ggagagctgg	acagatggga	gaaaattagg	60
ctgcccgcgg	gaggcaaaaa	gaaatacaag	ctcaagcata	tcgtgtgggc	ctcgagggag	120
cttgaacggg	ttgccgtgaa	cccaggcctg	ctgaaacat	ctgagggatg	tcgccagatc	180
ctggggcaat	tgcagccatc	cctccagacc	gggagtgaag	agctgaggtc	cttgataaac	240
acagtggcta	ccctctactg	cgtacaccag	aggatcgaga	ttaaggatac	caaggaggcc	300
ttggacaaaa	ttgaggagga	gcaaaacaag	agcaagaaga	aggcccagca	ggcagctgct	360
gacactgggc	atagcaacca	ggtatcacag	aactatccta	ttgtccaaaa	cattcagggc	420
cagatggttc	atcaggccat	cagcccccg	acgctcaatg	cctgggtgaa	ggttgcgaa	480
gagaaggcct	tttctcctga	ggttatcccc	atgttctccg	ctttgagtga	gggggcccact	540
cctcaggacc	tcaatacaat	gcttaatacc	gtggcgggcc	atcaggccgc	catgcaaatg	600
ttgaaggaga	ctatcaacga	ggaggcagcc	gagtgggaca	gagtgcattc	cgtccacgct	660
ggcccaatcg	cgcccggaca	gatgcgggag	cctcgcggct	ctgacattgc	cggcaccacc	720
tctacactgc	aagagcaaat	cggtggatg	accaacaatc	ctcccattcc	agttggagaa	780
atctataaac	ggtggatcat	cctgggcctg	aacaagatcg	tgcgcatgta	ctctccgaca	840
tccatccttg	acattagaca	gggacccaaa	gagccttcta	gggattacgt	cgaccggttt	900
tataagaccc	tgcgagcaga	gcaggcctct	caggaggtca	aaaactggat	gacggagaca	960
ctcctggtac	agaacgctaa	ccccgactgc	aaaacaatct	tgaaggcact	aggcccggct	1020
gccaccctgg	aaagatgat	gaccgctgt	cagggatag	gcccggaccg	acacaaagcc	1080
agagtgttga	tgggccccat	cagtcccatc	gagaccgtgc	cggtgaagct	gaaacccggg	1140
atggacggcc	ccaaggtcaa	gcagtggcca	ctcaccgagg	agaagatcaa	ggcctggtg	1200
gagatctgca	ccgagatgga	gaaagagggc	aagatcagca	agatcgggcc	ggagaacca	1260
tacaacaccc	ccgtgtttgc	catcaagaag	aaggacagca	ccaagtggcg	caagctggtg	1320
gatttccggg	agctgaataa	gcggaccag	gatttctggg	aggtccagct	gggcatcccc	1380
catccggccc	gcctgaagaa	gaagaagagc	gtgaccgtgc	tggacgtggg	cgacgcttac	1440
ttcagcgtcc	ctctggacga	ggactttaga	aagtacaccg	cctttaccat	cccatctatc	1500
aacaacgaga	cccctggcat	cagatatcag	tacaacgtcc	tccccaggg	ctggaagggc	1560
tctcccgcca	ttttccagag	ctccatgacc	aagatcctgg	agccgtttcg	gaagcagaac	1620
cccgatatcg	tcctctacca	gtacatggac	gacctgtacg	tgggctctga	cctggaaatc	1680
gggcagcatc	gcacgaagat	tgaggagctg	aggcagcatc	tgctgagatg	ggcctgacc	1740
actccggaca	agaagcatca	gaaggagccc	ccattcctga	agatgggcta	cgagctccat	1800
cccgacaagt	ggaccgtgca	gcctatcgtc	ctccccgaga	aggacagctg	gaccgtgaa	1860
gacatccaga	agctgtggg	caagctcaac	tgggctagcc	agatctatcc	ccggtcaag	1920
gtgcgccagc	tctgcaagct	gctgcgcggc	accaaggccc	tgaccgaggt	gattcccctc	1980
acggaggaag	ccgagctcga	gctggctgag	aaccgggaga	tccgaagga	gcccgtgca	2040
ggcgtgtact	atgacccctc	caaggacctg	atcggcga	tccagaagca	gggccagggg	2100
cagtggacat	accagattta	ccaggagcct	ttcaagaacc	tcaagaccgg	caagtacgcc	2160
cgcagtaggg	gcgcccacac	caacgatgtc	aagcagctga	ccgaggccgt	ccagaagatc	2220
acgaccgagt	ccatcgtgat	ctgggggaag	acacccaagt	tcaagctgcc	tatccagaag	2280
gagacctggg	agacgtggtg	gaccgaatat	tggcaggcca	cctggattcc	cgagtgggag	2340
ttcgtgaata	cacctcctct	ggtgaagctg	tggtaccagc	tcgagaagga	gccccctgtg	2400
ggcgcgggaga	cattctacgt	ggacggcgcg	gccaaccccg	aaacaaagct	cgggaaggcc	2460
gggtacgtca	ccaaccgggg	ccgccagaag	gtcgtcacc	tgaccgacac	caccaaccag	2520
aagacggagc	tgcaggccat	ctatctcgtc	ctccaggact	ccggcctgga	ggtgaacatc	2580
gtgacggaca	gccagtacgc	gctgggcatt	atcaggccc	agccggacca	gtccgagagc	2640
gaaactggtga	accagattat	cgagcagctg	atcaagaaag	agaaggtcta	cctcgcctgg	2700
gtcccggccc	ataaggcat	tggcggcaac	gagcaggtcg	acaagctggt	gagtgcgggg	2760
attagaaagg	tgctgatggt	gggttttcca	gtcacacctc	aggtaccttt	aagaccaatg	2820
acttacaagg	cagctgtaga	tcttagccac	tttttaaaag	aaaagggggg	actggaaggg	2880
ctaattcact	cccaaagaag	acaagatata	cttgatctgt	ggatctacca	cacacaaggc	2940
tacttccctg	attggcagaa	ctacacacca	gggccagggg	tcagatatcc	actgaccttt	3000
ggatggtgct	acaagctagt	accagttgag	ccagataaag	tagaagagcc	caataaagga	3060
gagaacacca	ccctgttaca	ccctgtgagc	ctgcatggga	tggatgacct	ggagagagaa	3120
gtgttagagt	ggaggtttga	cagccgccta	gcatttctatc	acgtggcccc	agagctgcat	3180
ccggagtact	tcaagaactg	ctga				3204

<210> 2
 <211> 1067
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 744 676 T3

<223> VIH

<400> 2

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

ES 2 744 676 T3

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
 305 310 315 320
 Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
 325 330 335
 Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
 340 345 350
 Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Met Gly Pro Ile Ser
 355 360 365
 Pro Ile Glu Thr Val Pro Val Lys Leu Lys Pro Gly Met Asp Gly Pro
 370 375 380
 Lys Val Lys Gln Trp Pro Leu Thr Glu Glu Lys Ile Lys Ala Leu Val
 385 390 395 400
 Glu Ile Cys Thr Glu Met Glu Lys Glu Gly Lys Ile Ser Lys Ile Gly
 405 410 415
 Pro Glu Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Val Phe Ala Ile Lys Lys Lys Asp
 420 425 430
 Ser Thr Lys Trp Arg Lys Leu Val Asp Phe Arg Glu Leu Asn Lys Arg
 435 440 445
 Thr Gln Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu Gly Ile Pro His Pro Ala Gly
 450 455 460
 Leu Lys Lys Lys Lys Ser Val Thr Val Leu Asp Val Gly Asp Ala Tyr
 465 470 475 480
 Phe Ser Val Pro Leu Asp Glu Asp Phe Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Thr
 485 490 495
 Ile Pro Ser Ile Asn Asn Glu Thr Pro Gly Ile Arg Tyr Gln Tyr Asn
 500 505 510
 Val Leu Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro Ala Ile Phe Gln Ser Ser
 515 520 525
 Met Thr Lys Ile Leu Glu Pro Phe Arg Lys Gln Asn Pro Asp Ile Val
 530 535 540
 Ile Tyr Gln Tyr Met Asp Asp Leu Tyr Val Gly Ser Asp Leu Glu Ile
 545 550 555 560
 Gly Gln His Arg Thr Lys Ile Glu Glu Leu Arg Gln His Leu Leu Arg
 565 570 575
 Trp Gly Leu Thr Thr Pro Asp Lys Lys His Gln Lys Glu Pro Pro Phe
 580 585 590
 Leu Lys Met Gly Tyr Glu Leu His Pro Asp Lys Trp Thr Val Gln Pro
 595 600 605
 Ile Val Leu Pro Glu Lys Asp Ser Trp Thr Val Asn Asp Ile Gln Lys
 610 615 620
 Leu Val Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln Ile Tyr Pro Gly Ile Lys
 625 630 635 640
 Val Arg Gln Leu Cys Lys Leu Leu Arg Gly Thr Lys Ala Leu Thr Glu
 645 650 655
 Val Ile Pro Leu Thr Glu Glu Ala Glu Leu Glu Leu Ala Glu Asn Arg
 660 665 670
 Glu Ile Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr Tyr Asp Pro Ser Lys
 675 680 685
 Asp Leu Ile Ala Glu Ile Gln Lys Gln Gly Gln Gly Gln Trp Thr Tyr
 690 695 700
 Gln Ile Tyr Gln Glu Pro Phe Lys Asn Leu Lys Thr Gly Lys Tyr Ala
 705 710 715 720
 Arg Met Arg Gly Ala His Thr Asn Asp Val Lys Gln Leu Thr Glu Ala
 725 730 735
 Val Gln Lys Ile Thr Thr Glu Ser Ile Val Ile Trp Gly Lys Thr Pro
 740 745 750
 Lys Phe Lys Leu Pro Ile Gln Lys Glu Thr Trp Glu Thr Trp Trp Thr
 755 760 765
 Glu Tyr Trp Gln Ala Thr Trp Ile Pro Glu Trp Glu Phe Val Asn Thr
 770 775 780
 Pro Pro Leu Val Lys Leu Trp Tyr Gln Leu Glu Lys Glu Pro Ile Val
 785 790 795 800
 Gly Ala Glu Thr Phe Tyr Val Asp Gly Ala Ala Asn Arg Glu Thr Lys

				805						810				815	
Leu	Gly	Lys	Ala	Gly	Tyr	Val	Thr	Asn	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Val	Val
			820					825					830		
Thr	Leu	Thr	Asp	Thr	Thr	Asn	Gln	Lys	Thr	Glu	Leu	Gln	Ala	Ile	Tyr
		835					840					845			
Leu	Ala	Leu	Gln	Asp	Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Asn	Ile	Val	Thr	Asp	Ser
		850				855					860				
Gln	Tyr	Ala	Leu	Gly	Ile	Ile	Gln	Ala	Gln	Pro	Asp	Gln	Ser	Glu	Ser
865					870					875				880	
Glu	Leu	Val	Asn	Gln	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu	Ile	Lys	Lys	Glu	Lys	Val
				885					890					895	
Tyr	Leu	Ala	Trp	Val	Pro	Ala	His	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Asn	Glu	Gln
			900					905					910		
Val	Asp	Lys	Leu	Val	Ser	Ala	Gly	Ile	Arg	Lys	Val	Leu	Met	Val	Gly
		915					920					925			
Phe	Pro	Val	Thr	Pro	Gln	Val	Pro	Leu	Arg	Pro	Met	Thr	Tyr	Lys	Ala
		930				935					940				
Ala	Val	Asp	Leu	Ser	His	Phe	Leu	Lys	Glu	Lys	Gly	Gly	Leu	Glu	Gly
945					950					955					960
Leu	Ile	His	Ser	Gln	Arg	Arg	Gln	Asp	Ile	Leu	Asp	Leu	Trp	Ile	Tyr
				965					970					975	
His	Thr	Gln	Gly	Tyr	Phe	Pro	Asp	Trp	Gln	Asn	Tyr	Thr	Pro	Gly	Pro
			980					985					990		
Gly	Val	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Trp	Cys	Tyr	Lys	Leu	Val	Pro
		995					1000						1005		
Val	Glu	Pro	Asp	Lys	Val	Glu	Glu	Ala	Asn	Lys	Gly	Glu	Asn	Thr	Ser
		1010				1015						1020			
Leu	Leu	His	Pro	Val	Ser	Leu	His	Gly	Met	Asp	Asp	Pro	Glu	Arg	Glu
1025					1030					1035					1040
Val	Leu	Glu	Trp	Arg	Phe	Asp	Ser	Arg	Leu	Ala	Phe	His	His	Val	Ala
				1045					1050					1055	
Arg	Glu	Leu	His	Pro	Glu	Tyr	Phe	Lys	Asn	Cys					
			1060					1065							

<210> 3
 <211> 4665
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> VIH

<400> 3

```

atggccgcca gagccagcat cctgagcggg ggcaagctgg acgcctggga gaagatcaga 60
ctgaggcctg gcggaagaa gaagtaccgg ctgaagcacc tgggtgtggc cagcagagag 120
ctggatcgct tcgccctgaa tcctagcctg ctggagacca ccgagggctg ccagcagatc 180
atgaaccagc tgcagcccgc cgtgaaaacc ggcaccgagg agatcaagag cctgttcaac 240
accgtggcca ccctgtactg cgtgcaccag cggatcgacg tgaaggatac caaggaggcc 300
ctggacaaga tcgaggagat ccagaacaag agcaagcaga aaaccagca ggccgctgcc 360
gacaccggcg acagcagcaa agtgagccag aactacccca tcatccagaa tgcccagggc 420
cagatgatcc accagaacct gagcccaga accctgaatg cctgggtgaa agtgatcgag 480
gaaaaggcct tcagcccga agtgatccct atgttcagcg ccctgagcga gggcgccacc 540
cccaggacc tgaacgtgat gctgaacatt gtgggcccgc accaggcccg catgcagatg 600
ctgaaggaca ccatcaatga ggaggcccgc gactgggaca gactgcacc cgtgcaggcc 660
ggaccatcc cccctggcca gatcagagag ccagaggca gcgacatcgc cggcaccacc 720
tccaccctc aagaacagct gcagtgatg accggcaacc ctcccatccc tgtgggcaac 780
atctacaagc ggtggatcat cctgggctg aacaagattg tgcggatgta cagcccctg 840
tccatcctgg atatcaagca gggcccgaag gagcccttca gagactacgt ggaccggttc 900
ttcaaggccc tgagagccga gcaggccacc caggacgtga agggctggat gaccgagacc 960
ctgctggtgc agaacgcaa cccgactgc aagagcatcc tgaaggccct ggccagcggc 1020
gccacactgg aggagatgat gaccgcctgc cagggagtgg gccgaccgg ccacaaggcc 1080
agagtgctgg ccgaggccat gagccaggcc cagcagacca acatcatgat gcagcggggc 1140
    
```

10

ES 2 744 676 T3

aacttcagag gccagaagcg gatcaagtgc ttcaactgcg gcaaggaggg ccacctggcc 1200
 agaaactgca gagccccag gaagaagggc tgctggaagt gtggcaagga agggcaccag 1260
 atgaaggact gcaccgagag gcaggccaat ttctctgggca agatttggcc tagcagcaag 1320
 ggcagacccg gcaatttccc ccagagcaga cccgagccca ccgcccctcc cgccgagctg 1380
 ttccgcatgg gcgagggcat cgccagcctg cccaagcagg agcagaagga cagagagcag 1440
 gtgccccccc tgggtgtccct gaagtccctg ttccggcaacg atcctctgag ccagggatcc 1500
 cccatcagcc ccatcgagac cgtgccctg accctgaagc ccggcatgga tggcccaaa 1560
 gtgaaacagt ggcccctgac cgaggagaag attaaggccc tgaccgaaat ctgtaccgag 1620
 atggagaagg agggcaagat cagcaagatc ggccccgaga acccctaca cacccccac 1680
 ttcccatca agaagaagga cagaccaag tgccggaaac tgggtgactt ccgggagctg 1740
 aacaagagga cccaggactt ctgggaagtg cagctgggca tccccacc tggccggcctg 1800
 aagaagaaga agtccgtgac agtgctggat gtgggcgacg cctacttcag cgtgccctg 1860
 gacgagaact tcaggaagta caccgccttc accatcccca gcaccaaca cgagacccc 1920
 ggagtgagat accagtaca cgtgctgctc cagggctgga agggcagccc cgccatcttc 1980
 cagagcagca tgaccaagat cctggagccc ttccggagca agaaccocga gatcatcatc 2040
 taccagtaca tggccgcctt gtatgtgggc agcatctgg agatcggcca gcacaggacc 2100
 aagatcgaag agctgagggc ccacctgctg agctggggct tcaccacccc cgataagaag 2160
 caccagaag agccccctt cctgtggatg ggctacgagc tgcaccccga taagtggacc 2220
 gtgcagccca tcatgctgcc cgataaggag agctggaccg tgaacgacat ccagaaactg 2280
 gtgggcaagc tgaattgggc cagccaaatc tacgcccggca ttaaagtga gcagctgtgc 2340
 aggctgctga gaggcgcaa agccctgaca gacatcgtga cactgacaga ggaggccgag 2400
 ctggagctgg ccgagaacag ggagatcctg aaggacccc tgcacggcgt gtactacgac 2460
 cccagcaagg acctggtggc cgagattcag aagcagggcc aggaccagtg gacctacca 2520
 atctaccagg agcctttcaa gaacctgaaa accgggaagt acgccaggaa gagaagcgcc 2580
 cacaccaag gtgatctggg gcaagacccc caagttcaag ctgcccaccc agaaggagac ctgggaaacc 2640
 tgggtgatgg actactggca ggccacctg attcctgagt gggagtctgt gaacacccc 2700
 cctctggtga agctgtggt tccagctggag aaggacccc tctggggcgc cgagacctc 2760
 tacgtggacg gagccgcaa tagagagacc aagctgggca aggccggcta cgtgaccgac 2820
 agagccagac agaaagtgt gtctctgacc gagacaacca accagaaaac cgagctgcac 2880
 gccatcctgc tggccctgca ggacagcggc agcgaagtga acatcgtgac cgactcccag 2940
 tacgcccagg gcatcattca ggcccagccc gatagaagcg agagcgagct ggtgaaccag 3000
 atcatcgaga atcatctgg caaggacaaa atctacctga gctgggtgcc cgcccacaag 3060
 ggcacggcg gcaacgagca ggtggacaag ctggtgtcca gcggcatccg gaaagtgctg 3120
 tttctggacg gcatcgacaa ggcccaggag gaccacgaga gataccacag caactggcgg 3180
 acaatggcca gogacttcaa cctgcctccc atcgtggcca aggagatcgt ggccagctgc 3240
 gataagtgtc agctgaaggg cgaggccatg cacggccagg tggactgcag ccctggcatc 3300
 tggcagctgg cctgcaccca cctggagggc aaagtgattc tgggtggcct gcaactggcc 3360
 agcggctaca tcgaggccga agtgattccc gccgagaccg gccaggagac cgcctacttc 3420
 ctgctgaaagc tggccggcag atggcccgtg aaagtgggtc acaccgcaa cggcagcaac 3480
 ttcacctctg ccgcccgtgaa ggcccctgt tggggggcca atatccagca gtagtccggc 3540
 atccccata accctcagag ccagggcctg ttggccagca tgaacaagga gctgaagaag 3600
 atcatcgccc aggtgagggg ccaggccgag cacctgaaaa cagccgtgca gatggccgtg 3660
 tcatccaca acttcaagcg gaagggcggc attggcggct acagcggcgg agagcggatc 3720
 atcgacatca togccaccga tatccagacc aaggaactgc agaagcagat caccaagatt 3780
 cagaacttca gagtgacta cgggacagc agggacccc tctggaaggg ccctgccaaag 3840
 ctgctgtgga agggcgaagg cgccgtggtg atccaggaca acagcgacat caaagtgggtg 3900
 ccccgagga aggccaaagat tctgcgggac tacggcaaac agatggcccg cgatgactgc 3960
 gtggccggca ggcagatga ggacagatct atggcggca agtgggtcaa gggcagcatt 4020
 gtgggtggcc ccgagatccg ggagagaatg agaagagccc ctgccggcgc tctggagtg 4080
 ggcgcccgtg ctccagatct ggataagcac ggcgccatca ccagcagcaa catcaacaac 4140
 cccagctgtg tgtggctgga ggcccaggaa gaggaggaag tgggcttccc tgtgagacc 4200
 caggtgcccc tgagacccat gacctacaag ggcgccttcg acctgagcca ctctctgaag 4260
 gagaagggcg gcctggacgg cctgatctac agccggagc ggcaggagat cctggatctg 4320
 tgggtgtacc acaccaggg ctacttcccc gactggcaga attacacccc tggccctgga 4380
 gtgcccgttc cctgacctt cggtggtgc ttcaagctgg tgccatgga gcccgacgaa 4440
 gtgagaagc ccacagagg cgagaacaac agcctgctgc accctatctg ccagcagcgc 4500
 atggacgatg aggagcggga agtgctgatc tggaaagtctg acagcaggct ggcctgaag 4560
 cacagagccc aggaactgca cccagagttc tacaaggact gctga 4620

- <210> 4
- <211> 1554
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 744 676 T3

<220>
 <223> VIH
 <400> 4

Met Ala Ala Arg Ala Ser Ile Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala Trp
 1 5 10 15
 Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Leu Lys
 20 25 30
 His Leu Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Asp Arg Phe Ala Leu Asn Pro
 35 40 45
 Ser Leu Leu Glu Thr Thr Glu Gly Cys Gln Gln Ile Met Asn Gln Leu
 50 55 60
 Gln Pro Ala Val Lys Thr Gly Thr Glu Glu Ile Lys Ser Leu Phe Asn
 65 70 75 80
 Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Asp Val Lys Asp
 85 90 95
 Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Gln Asn Lys Ser Lys
 100 105 110
 Gln Lys Thr Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly Asp Ser Ser Lys Val
 115 120 125
 Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Ile Gln Asn Ala Gln Gly Gln Met Ile His
 130 135 140
 Gln Asn Leu Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Ile Glu
 145 150 155 160
 Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
 165 170 175
 Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Val Met Leu Asn Ile Val Gly
 180 185 190
 Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Asp Thr Ile Asn Glu Glu
 195 200 205
 Ala Ala Glu Trp Asp Arg Leu His Pro Val Gln Ala Gly Pro Ile Pro
 210 215 220
 Pro Gly Gln Ile Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
 225 230 235 240
 Ser Thr Pro Gln Glu Gln Leu Gln Trp Met Thr Gly Asn Pro Pro Ile
 245 250 255
 Pro Val Gly Asn Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
 260 265 270
 Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Val Ser Ile Leu Asp Ile Lys Gln Gly
 275 280 285
 Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Phe Lys Ala Leu
 290 295 300
 Arg Ala Glu Gln Ala Thr Gln Asp Val Lys Gly Trp Met Thr Glu Thr
 305 310 315 320
 Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Ser Ile Leu Lys Ala
 325 330 335
 Leu Gly Ser Gly Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
 340 345 350
 Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser
 355 360 365
 Gln Ala Gln Gln Thr Asn Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg Gly
 370 375 380
 Gln Lys Arg Ile Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Leu Ala
 385 390 395 400
 Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly Lys
 405 410 415
 Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn Phe Leu
 420 425 430
 Gly Lys Ile Trp Pro Ser Ser Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe Pro Gln
 435 440 445
 Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Ala Glu Leu Phe Gly Met Gly

ES 2 744 676 T3

450						455						460					
Glu	Gly	Ile	Ala	Ser	Leu	Pro	Lys	Gln	Glu	Gln	Lys	Asp	Arg	Glu	Gln		
465					470					475				480			
Val	Pro	Pro	Leu	Val	Ser	Leu	Lys	Ser	Leu	Phe	Gly	Asn	Asp	Pro	Leu		
				485					490					495			
Ser	Gln	Gly	Ser	Pro	Ile	Ser	Pro	Ile	Glu	Thr	Val	Pro	Val	Thr	Leu		
			500					505					510				
Lys	Pro	Gly	Met	Asp	Gly	Pro	Lys	Val	Lys	Gln	Trp	Pro	Leu	Thr	Glu		
		515					520					525					
Glu	Lys	Ile	Lys	Ala	Leu	Thr	Glu	Ile	Cys	Thr	Glu	Met	Glu	Lys	Glu		
		530				535					540						
Gly	Lys	Ile	Ser	Lys	Ile	Gly	Pro	Glu	Asn	Pro	Tyr	Asn	Thr	Pro	Ile		
545					550					555					560		
Phe	Ala	Ile	Lys	Lys	Lys	Asp	Ser	Thr	Lys	Trp	Arg	Lys	Leu	Val	Asp		
			565						570					575			
Phe	Arg	Glu	Leu	Asn	Lys	Arg	Thr	Gln	Asp	Phe	Trp	Glu	Val	Gln	Leu		
			580					585					590				
Gly	Ile	Pro	His	Pro	Ala	Gly	Leu	Lys	Lys	Lys	Lys	Ser	Val	Thr	Val		
		595				600						605					
Leu	Asp	Val	Gly	Asp	Ala	Tyr	Phe	Ser	Val	Pro	Leu	Asp	Glu	Asn	Phe		
610						615						620					
Arg	Lys	Tyr	Thr	Ala	Phe	Thr	Ile	Pro	Ser	Thr	Asn	Asn	Glu	Thr	Pro		
625				630						635					640		
Gly	Val	Arg	Tyr	Gln	Tyr	Asn	Val	Leu	Pro	Gln	Gly	Trp	Lys	Gly	Ser		
			645					650						655			
Pro	Ala	Ile	Phe	Gln	Ser	Ser	Met	Thr	Lys	Ile	Leu	Glu	Pro	Phe	Arg		
			660					665						670			
Ser	Lys	Asn	Pro	Glu	Ile	Ile	Ile	Tyr	Gln	Tyr	Met	Ala	Ala	Leu	Tyr		
		675					680					685					
Val	Gly	Ser	Asp	Leu	Glu	Ile	Gly	Gln	His	Arg	Thr	Lys	Ile	Glu	Glu		
690						695						700					
Leu	Arg	Ala	His	Leu	Leu	Ser	Trp	Gly	Phe	Thr	Thr	Pro	Asp	Lys	Lys		
705				710						715					720		
His	Gln	Lys	Glu	Pro	Pro	Phe	Leu	Trp	Met	Gly	Tyr	Glu	Leu	His	Pro		
			725						730					735			
Asp	Lys	Trp	Thr	Val	Gln	Pro	Ile	Met	Leu	Pro	Asp	Lys	Glu	Ser	Trp		
			740					745						750			
Thr	Val	Asn	Asp	Ile	Gln	Lys	Leu	Val	Gly	Lys	Leu	Asn	Trp	Ala	Ser		
		755					760						765				
Gln	Ile	Tyr	Ala	Gly	Ile	Lys	Val	Lys	Gln	Leu	Cys	Arg	Leu	Leu	Arg		
770						775					780						
Gly	Ala	Lys	Ala	Leu	Thr	Asp	Ile	Val	Thr	Leu	Thr	Glu	Glu	Ala	Glu		
785					790					795					800		
Leu	Glu	Leu	Ala	Glu	Asn	Arg	Glu	Ile	Leu	Lys	Asp	Pro	Val	His	Gly		
			805						810					815			
Val	Tyr	Tyr	Asp	Pro	Ser	Lys	Asp	Leu	Val	Ala	Glu	Ile	Gln	Lys	Gln		
			820					825						830			
Gly	Gln	Asp	Gln	Trp	Thr	Tyr	Gln	Ile	Tyr	Gln	Glu	Pro	Phe	Lys	Asn		
		835					840						845				
Leu	Lys	Thr	Gly	Lys	Tyr	Ala	Arg	Lys	Arg	Ser	Ala	His	Thr	Asn	Asp		
850						855					860						
Val	Arg	Gln	Leu	Ala	Glu	Val	Val	Gln	Lys	Val	Ala	Met	Glu	Ser	Ile		
865					870					875					880		
Val	Ile	Trp	Gly	Lys	Thr	Pro	Lys	Phe	Lys	Leu	Pro	Ile	Gln	Lys	Glu		
			885						890					895			
Thr	Trp	Glu	Thr	Trp	Trp	Met	Asp	Tyr	Trp	Gln	Ala	Thr	Trp	Ile	Pro		
		900						905						910			
Glu	Trp	Glu	Phe	Val	Asn	Thr	Pro	Pro	Leu	Val	Lys	Leu	Trp	Tyr	Gln		
		915					920							925			
Leu	Glu	Lys	Asp	Pro	Ile	Leu	Gly	Ala	Glu	Thr	Phe	Tyr	Val	Asp	Gly		
930						935					940						
Ala	Ala	Asn	Arg	Glu	Thr	Lys	Leu	Gly	Lys	Ala	Gly	Tyr	Val	Thr	Asp		
945					950						955				960		

ES 2 744 676 T3

Arg Gly Arg Gln Lys Val Val Ser Leu Thr Glu Thr Thr Asn Gln Lys
 965 970 975
 Thr Glu Leu His Ala Ile Leu Leu Ala Leu Gln Asp Ser Gly Ser Glu
 980 985 990
 Val Asn Ile Val Thr Asp Ser Gln Tyr Ala Leu Gly Ile Ile Gln Ala
 995 1000 1005
 Gln Pro Asp Arg Ser Glu Ser Glu Leu Val Asn Gln Ile Ile Glu Lys
 1010 1015 1020
 Leu Ile Gly Lys Asp Lys Ile Tyr Leu Ser Trp Val Pro Ala His Lys
 1025 1030 1035 1040
 Gly Ile Gly Gly Asn Glu Gln Val Asp Lys Leu Val Ser Ser Gly Ile
 1045 1050 1055
 Arg Lys Val Leu Phe Leu Asp Gly Ile Asp Lys Ala Gln Glu Asp His
 1060 1065 1070
 Glu Arg Tyr His Ser Asn Trp Arg Thr Met Ala Ser Asp Phe Asn Leu
 1075 1080 1085
 Pro Pro Ile Val Ala Lys Glu Ile Val Ala Ser Cys Asp Lys Cys Gln
 1090 1095 1100
 Leu Lys Gly Glu Ala Met His Gly Gln Val Asp Cys Ser Pro Gly Ile
 1105 1110 1115 1120
 Trp Gln Leu Ala Cys Thr His Leu Glu Gly Lys Val Ile Leu Val Ala
 1125 1130 1135
 Val His Val Ala Ser Gly Tyr Ile Glu Ala Glu Val Ile Pro Ala Glu
 1140 1145 1150
 Thr Gly Gln Glu Thr Ala Tyr Phe Leu Leu Lys Leu Ala Gly Arg Trp
 1155 1160 1165
 Pro Val Lys Val Val His Thr Ala Asn Gly Ser Asn Phe Thr Ser Ala
 1170 1175 1180
 Ala Val Lys Ala Ala Cys Trp Trp Ala Asn Ile Gln Gln Glu Phe Gly
 1185 1190 1195 1200
 Ile Pro Tyr Asn Pro Gln Ser Gln Gly Val Val Ala Ser Met Asn Lys
 1205 1210 1215
 Glu Leu Lys Lys Ile Ile Gly Gln Val Arg Asp Gln Ala Glu His Leu
 1220 1225 1230
 Lys Thr Ala Val Gln Met Ala Val Phe Ile His Asn Phe Lys Arg Lys
 1235 1240 1245
 Gly Gly Ile Gly Gly Tyr Ser Ala Gly Glu Arg Ile Ile Asp Ile Ile
 1250 1255 1260
 Ala Thr Asp Ile Gln Thr Lys Glu Leu Gln Lys Gln Ile Thr Lys Ile
 1265 1270 1275 1280
 Gln Asn Phe Arg Val Tyr Tyr Arg Asp Ser Arg Asp Pro Ile Trp Lys
 1285 1290 1295
 Gly Pro Ala Lys Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala Val Val Ile Gln
 1300 1305 1310
 Asp Asn Ser Asp Ile Lys Val Val Pro Arg Arg Lys Ala Lys Ile Leu
 1315 1320 1325
 Arg Asp Tyr Gly Lys Gln Met Ala Gly Asp Asp Cys Val Ala Gly Arg
 1330 1335 1340
 Gln Asp Glu Asp Arg Ser Met Gly Gly Lys Trp Ser Lys Gly Ser Ile
 1345 1350 1355 1360
 Val Gly Trp Pro Glu Ile Arg Glu Arg Met Arg Arg Ala Pro Ala Ala
 1365 1370 1375
 Ala Pro Gly Val Gly Ala Val Ser Gln Asp Leu Asp Lys His Gly Ala
 1380 1385 1390
 Ile Thr Ser Ser Asn Ile Asn Asn Pro Ser Cys Val Trp Leu Glu Ala
 1395 1400 1405
 Gln Glu Glu Glu Glu Val Gly Phe Pro Val Arg Pro Gln Val Pro Leu
 1410 1415 1420
 Arg Pro Met Thr Tyr Lys Gly Ala Phe Asp Leu Ser His Phe Leu Lys
 1425 1430 1435 1440
 Glu Lys Gly Gly Leu Asp Gly Leu Ile Tyr Ser Arg Lys Arg Gln Glu
 1445 1450 1455
 Ile Leu Asp Leu Trp Val Tyr His Thr Gln Gly Tyr Phe Pro Asp Trp

<220>
 <223> VIH
 <400> 6

Met	Arg	Val	Met	Glu	Ile	Gln	Arg	Asn	Cys	Gln	His	Leu	Leu	Arg	Trp
1				5					10					15	
Gly	Ile	Met	Ile	Leu	Gly	Met	Ile	Ile	Ile	Cys	Ser	Thr	Ala	Asp	Asn
			20					25					30		
Leu	Trp	Val	Thr	Val	Tyr	Tyr	Gly	Val	Pro	Val	Trp	Arg	Asp	Ala	Glu
		35					40					45			
Thr	Thr	Leu	Phe	Cys	Ala	Ser	Asp	Ala	Lys	Ala	Tyr	Ser	Thr	Glu	Lys
		50				55					60				
His	Asn	Val	Trp	Ala	Thr	His	Ala	Cys	Val	Pro	Thr	Asp	Pro	Asn	Pro
65					70					75					80
Gln	Glu	Ile	Pro	Leu	Asp	Asn	Val	Thr	Glu	Glu	Phe	Asn	Met	Trp	Lys
				85					90					95	
Asn	Asn	Met	Val	Asp	Gln	Met	His	Glu	Asp	Ile	Ile	Ser	Leu	Trp	Asp
			100					105					110		
Gln	Ser	Leu	Lys	Pro	Cys	Val	Gln	Leu	Thr	Pro	Leu	Cys	Val	Thr	Leu
		115					120					125			
Asn	Cys	Ser	Asn	Ala	Arg	Val	Asn	Ala	Thr	Phe	Asn	Ser	Thr	Glu	Asp
						135						140			
Arg	Glu	Gly	Met	Lys	Asn	Cys	Ser	Phe	Asn	Met	Thr	Thr	Glu	Leu	Arg
145					150					155					160
Asp	Lys	Lys	Gln	Gln	Val	Tyr	Ser	Leu	Phe	Tyr	Arg	Leu	Asp	Ile	Glu
				165					170					175	
Lys	Ile	Asn	Ser	Ser	Asn	Asn	Asn	Ser	Glu	Tyr	Arg	Leu	Val	Asn	Cys
			180					185					190		
Asn	Thr	Ser	Ala	Ile	Thr	Gln	Ala	Cys	Pro	Lys	Val	Thr	Phe	Glu	Pro
		195					200						205		
Ile	Pro	Ile	His	Tyr	Cys	Ala	Pro	Ala	Gly	Phe	Ala	Ile	Leu	Lys	Cys
		210				215						220			
Asn	Asp	Thr	Glu	Phe	Asn	Gly	Thr	Gly	Pro	Cys	Lys	Asn	Val	Ser	Thr
225					230					235					240
Val	Gln	Cys	Thr	His	Gly	Ile	Lys	Pro	Val	Val	Ser	Thr	Gln	Leu	Leu
				245					250					255	
Leu	Asn	Gly	Ser	Leu	Ala	Glu	Arg	Glu	Val	Arg	Ile	Arg	Ser	Glu	Asn
			260					265					270		
Ile	Ala	Asn	Asn	Ala	Lys	Asn	Ile	Val	Gln	Phe	Ala	Ser	Pro	Val	
		275					280					285			
Lys	Ile	Asn	Cys	Ile	Arg	Pro	Asn	Asn	Asn	Thr	Arg	Lys	Ser	Tyr	Arg
		290				295					300				
Ile	Gly	Pro	Gly	Gln	Thr	Phe	Tyr	Ala	Thr	Asp	Ile	Val	Gly	Asp	Ile
305					310					315					320
Arg	Gln	Ala	His	Cys	Asn	Val	Ser	Arg	Thr	Asp	Trp	Asn	Asn	Thr	Leu
				325					330					335	
Arg	Leu	Val	Ala	Asn	Gln	Leu	Arg	Lys	Tyr	Phe	Ser	Asn	Lys	Thr	Ile
			340					345					350		
Ile	Phe	Thr	Asn	Ser	Ser	Gly	Gly	Asp	Leu	Glu	Ile	Thr	Thr	His	Ser
		355					360					365			
Phe	Asn	Cys	Gly	Gly	Glu	Phe	Phe	Tyr	Cys	Asn	Thr	Ser	Gly	Leu	Phe
		370				375					380				
Asn	Ser	Thr	Trp	Thr	Thr	Asn	Asn	Met	Gln	Glu	Ser	Asn	Asp	Thr	Ser
385					390					395					400
Asn	Gly	Thr	Ile	Thr	Leu	Pro	Cys	Arg	Ile	Lys	Gln	Ile	Ile	Arg	Met
				405					410					415	
Trp	Gln	Arg	Val	Gly	Gln	Ala	Met	Tyr	Ala	Pro	Pro	Ile	Glu	Gly	Val
			420					425					430		
Ile	Arg	Cys	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr	Gly	Leu	Ile	Leu	Thr	Arg	Asp	Gly
		435					440					445			
Gly	Asn	Asn	Asn	Ser	Ala	Asn	Glu	Thr	Phe	Arg	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp
		450				455					460				

ES 2 744 676 T3

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

<210> 7
 <211> 1545
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VIH

<400> 7

atgaaagtga aggagaccag gaagaattat cagcacttgt ggagatgggg caccatgctc 60
 cttgggatgt tgatgatctg tagtgctgca gaacaattgt gggtcacagt ctattatggg 120
 gtaoctgtgt gaaagaagc aactaccact ctattctgtg catcagatgc taaagcatal 180
 gatacagagg tacataatgt ttgggccaca catgcctgtg taccacacaga cccaaccca 240
 caagaagttag tattgggaaa tgtgacagaa tattttaaca tgtggaaaaa taacatggta 300
 gaccagatgc atgaggatat aatcagttta tgggatcaaa gcttgaagcc atgtgtaaaa 360
 ttaaccocac tctgtgttac tttagattgc gatgatgtga ataccactaa tagtactact 420
 accactagta atggttgagc aggagaaata aggaaaggag aaataaaaaa ctgctctttt 480
 aatatcacca caagcataag agataagggtt caaaaaagaat atgcactttt ttataacctt 540
 gatgtagtac caatagatga tgataatgct actaccacaaa ataaaactac tagaaacttt 600
 aggttgatac attgtaactc ctcagtcag acacaggcct gtccaaggt atcatttgaa 660
 ccaattccca tacattattg tgccccggct ggttttgcca ttctgaagtg taacaataag 720
 acgtttgatg gaaaaggact atgtacaaat gtcagcacag tacaatgtac acatgggaatt 780
 aggccagtag tgtcaactca actgctgttaaat atggcagtc tagcagaaga agaggtagta 840
 attagatctg acaatttcat ggacaatact aaaaccataa tagtacagct gaatgaatct 900
 gtagcaatta attgtacaag acccaacaac aatacaagaa aaggtataca tataggacca 960
 gggagagcct tttatgcagc aagaaaaata ataggagata taagacaagc acattgtaac 1020
 cttagtagag cacaatggaa taacacttta aaacagatag ttataaaatt aagagaacac 1080
 tttgggaata aaacaataaa atttaataca tcctcaggag gggaccaga aattgtaag 1140
 catagtttta attgtggagg ggaatttttc tactgtgata caacacaact gtttaaatagt 1200
 acttggaatg gtactgaagg aaataacact gaaggaaata gcacaatcac actcccatgt 1260
 agaataaac aaattataaa catgtggcag gaagtaggaa aagcaatgta tgcccctccc 1320
 atcggaggac aaattagatg ttcatacaat attacagggc tgctattaac aagagatggt 1380
 ggtaccgaag ggaatgggac agagaatgag acagagatct tcagacctgg aggaggagat 1440

atgagggaca attggagaag tgaattatat aaatataaag tagtaaaagt tgaaccacta 1500
 ggagtagcac ccaccaggcc aaagagaaga gtggtgcaga gataa 1545

<210> 8
 <211> 514

ES 2 744 676 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VIH

5 <400> 8

```

Met Lys Val Lys Glu Thr Arg Lys Asn Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp
 1      5      10      15
Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Ala Glu Gln
 20      25      30
Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala Thr
 35      40      45
Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu Val
 50      55      60
His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn Pro
 65      70      75      80
Gln Glu Val Val Leu Gly Asn Val Thr Glu Tyr Phe Asn Met Trp Lys
 85      90      95
Asn Asn Met Val Asp Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp Asp
 100
Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu
 115      120      125
Asp Cys Asp Asp Val Asn Thr Thr Asn Ser Thr Thr Thr Thr Ser Asn
 130      135      140
Gly Trp Thr Gly Glu Ile Arg Lys Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe
 145      150      155      160
Asn Ile Thr Thr Ser Ile Arg Asp Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Leu
 165      170      175
Phe Tyr Asn Leu Asp Val Val Pro Ile Asp Asp Asp Asn Ala Thr Thr
 180      185      190
Lys Asn Lys Thr Thr Arg Asn Phe Arg Leu Ile His Cys Asn Ser Ser
 195      200      205
Val Met Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile
 210      215      220
His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys
 225      230      235      240
Thr Phe Asp Gly Lys Gly Leu Cys Thr Asn Val Ser Thr Val Gln Cys
 245      250      255
Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly
 260      265      270
Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Val Ile Arg Ser Asp Asn Phe Met Asp
 275      280      285
Asn Thr Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn Glu Ser Val Ala Ile Asn
 290      295      300
Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Gly Ile His Ile Gly Pro
 305      310      315      320
Gly Arg Ala Phe Tyr Ala Ala Arg Lys Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln
 325      330      335
Ala His Cys Asn Leu Ser Arg Ala Gln Trp Asn Asn Thr Leu Lys Gln
 340      345      350
Ile Val Ile Lys Leu Arg Glu His Phe Gly Asn Lys Thr Ile Lys Phe
 355      360      365
Asn Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu Ile Val Arg His Ser Phe Asn
 370      375      380
Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asp Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser
 385      390      395      400
Thr Trp Asn Gly Thr Glu Gly Asn Asn Thr Glu Gly Asn Ser Thr Ile
    
```

ES 2 744 676 T3

				405						410				415	
Thr	Leu	Pro	Cys	Arg	Ile	Lys	Gln	Ile	Ile	Asn	Met	Trp	Gln	Glu	Val
			420					425					430		
Gly	Lys	Ala	Met	Tyr	Ala	Pro	Pro	Ile	Gly	Gly	Gln	Ile	Arg	Cys	Ser
		435					440					445			
Ser	Asn	Ile	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Arg	Asp	Gly	Gly	Thr	Glu	Gly
	450				455					460					
Asn	Gly	Thr	Glu	Asn	Glu	Thr	Glu	Ile	Phe	Arg	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp
465				470						475					480
Met	Arg	Asp	Asn	Trp	Arg	Ser	Glu	Leu	Tyr	Lys	Tyr	Lys	Val	Val	Lys
			485						490					495	
Val	Glu	Pro	Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Thr	Arg	Ala	Lys	Arg	Arg	Val	Val
			500					505						510	
Gln	Arg														

<210> 9
 <211> 2178
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 9

10

```

atgcatcaca cggccgcgct cgataacttc cagctgtccc aggggtgggca gggattcgcc 60
attccgatcg ggcaggcgat ggcgatcgcg ggcagatcc gatcgggtgg ggggtcacc 120
accgttcata tcgggcctac cgccttcctc ggcttgggtg ttgtcgacaa caacggcaac 180
ggcgcacgag tccaacgcgt ggtcgggagc gctccggcgg caagtctcgg catctccacc 240
ggcgacgtga tcaccgcggt cgacggcgct ccgatcaact cggccaccgc gatggcggac 300
gcgcttaacg ggcacatccc cggtgacgtc atctcggtga cctggcaaac caagtccggc 360
ggcagcgcta cagggaacgt gacattggcc gagggacccc cggccgaatt catggtggat 420
ttcgggcgct taccaccgga gatcaactcc gcgaggatgt acgcccggccc gggttcggcc 480
tcgctgggtg ccgcggtcca gatgtgggac agcgtggcga gtgacctgtt tcggcccgcg 540
tcggcgcttc agtcgggtgt ctggggctcg acgggtgggt cgtggatagg ttcgtcggcg 600
ggctctgatg tggcggcggc ctcgccgat gtggcgtgga tgagcgtcac cgcggggcag 660
gccgagctga ccgcccacca ggtcggggtt gctgcggcgg cctacgagac ggcgtatggg 720
ctgacggtgc ccccgcgggt gatcgccgag aaccgtgctg aactgatgat tctgatagcg 780
accaacctct tggggcaaaa caccocggcg atcgcgggtc acgaggccga ataccgagag 840
atgtgggccc aagacgccgc cgcgatgttt ggctacgccg cggcgacggc gacggcgacg 900
gcgacgttgc tgccgttcga ggaggcggc gagatgacca gcgcggtgg gctcctcgag 960
caggccggcg cggtcgagga ggcctccgac accgcccggc cgaaccagtt gatgaacaat 1020
gtgccccagg cgctgcaaca gctggcccag cccacgcagg gcaccacgcc ttcttccaag 1080
ctgggtggcc tgtggaagac ggtctcgccc catcgggtcgc cgatcagcaa catggtgtcg 1140
atggccaaca accacatgtc gatgaccaac tcgggtgtgt cgatgaccaa caccttgagc 1200
tcgatgttga agggcttgc tcggcgggcg gccgcccagg ccgtgcaaac cgcggcgcaa 1260
aacggggtcc gggcgatgag ctcgctgggc agctcgctgg gttcttcggg tctggcggtt 1320
gggggtggcg ccaacttggg tcgggcggcc tcggtcgggt cgttgtcggg gccgcaggcc 1380
tgggccgcgg ccaaccaggc agtcaccccg gcggcgcggg cgctgccgct gaccagcctg 1440
accagcggcg cggaaagagg gcccgggcag atgctgggcg ggctgccggt ggggcagatg 1500
ggcgccaggg ccgggtgtgg gctcagtggt gtgcgctg tcocgcccgc accctatgtg 1560
atgccgcaat ctccggcagc cggcgatata gcccccggc ccttgtcgca ggaccggttc 1620
gccgaactcc ccgcgctgcc cctcgaccgg tcggcgatgg tcgcccaggt ggggccacag 1680
gtgggtcaaca tcaacaccaa actgggctac aacaacggcg tggcgcccgg gaccggcatc 1740
gtcatcgatc ccaacggtgt cgtgctgacc aacaaccacg tgatcgcggg cgcaccggac 1800
atcaatgcgt tcagcgtcgg ctccggccaa acctacggcg tcgatgtggt cgggtatgac 1860
cgcaccagg atgtcgggt gctgcagctg cgcgggtgcc gtggcctgcc gtcggcgggc 1920
atcggtgccg gcgtcgggt tggtgagccc gtcgctcgca tgggcaacag cgtggggcag 1980
ggcggaacgc cccgtgcggt gcctggcagg gtggctcgcg tcggccaaac cgtgcaggcg 2040
tcggattcgc tgaccggtgc cgaagagaca ttgaacgggt tgatccagtt cgatcccgcg 2100
atccagcccg gtgatgcggg cgggcccgtc gtcaacggcc taggacaggt gbtccggtatg 2160
aacacggccc cgtcctag 2178
    
```

<210> 10
 <211> 725
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 10

```

Met His His Thr Ala Ala Ser Asp Asn Phe Gln Leu Ser Gln Gly Gly
 1      5      10      15
Gln Gly Phe Ala Ile Pro Ile Gly Gln Ala Met Ala Ile Ala Gly Gln
 20      25      30
Ile Arg Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Val His Ile Gly Pro Thr Ala
 35      40      45
Phe Leu Gly Leu Gly Val Val Asp Asn Asn Gly Asn Gly Ala Arg Val
 50      55      60
Gln Arg Val Val Gly Ser Ala Pro Ala Ala Ser Leu Gly Ile Ser Thr
 65      70      75      80
Gly Asp Val Ile Thr Ala Val Asp Gly Ala Pro Ile Asn Ser Ala Thr
 85      90      95
Ala Met Ala Asp Ala Leu Asn Gly His His Pro Gly Asp Val Ile Ser
 100     105     110
Val Thr Trp Gln Thr Lys Ser Gly Gly Thr Arg Thr Gly Asn Val Thr
 115     120     125
Leu Ala Glu Gly Pro Pro Ala Glu Phe Met Val Asp Phe Gly Ala Leu
 130     135     140
Pro Pro Glu Ile Asn Ser Ala Arg Met Tyr Ala Gly Pro Gly Ser Ala
 145     150     155     160
Ser Leu Val Ala Ala Gln Met Trp Asp Ser Val Ala Ser Asp Leu
 165     170     175
Phe Ser Ala Ala Ser Ala Phe Gln Ser Val Val Trp Gly Leu Thr Val
 180     185     190
Gly Ser Trp Ile Gly Ser Ser Ala Gly Leu Met Val Ala Ala Ala Ser
 195     200     205
Pro Tyr Val Ala Trp Met Ser Val Thr Ala Gly Gln Ala Glu Leu Thr
 210     215     220
Ala Ala Gln Val Arg Val Ala Ala Ala Tyr Glu Thr Ala Tyr Gly
 225     230     235     240
Leu Thr Val Pro Pro Val Ile Ala Glu Asn Arg Ala Glu Leu Met
 245     250     255
Ile Leu Ile Ala Thr Asn Leu Leu Gly Gln Asn Thr Pro Ala Ile Ala
 260     265     270
Val Asn Glu Ala Glu Tyr Gly Glu Met Trp Ala Gln Asp Ala Ala Ala
 275     280     285
Met Phe Gly Tyr Ala Ala Ala Thr Ala Thr Ala Thr Ala Thr Leu Leu
 290     295     300
Pro Phe Glu Glu Ala Pro Glu Met Thr Ser Ala Gly Gly Leu Leu Glu
 305     310     315     320
Gln Ala Ala Ala Val Glu Glu Ala Ser Asp Thr Ala Ala Ala Asn Gln
 325     330     335
Leu Met Asn Asn Val Pro Gln Ala Leu Gln Gln Leu Ala Gln Pro Thr
 340     345     350
Gln Gly Thr Thr Pro Ser Ser Lys Leu Gly Gly Leu Trp Lys Thr Val
 355     360     365
Ser Pro His Arg Ser Pro Ile Ser Asn Met Val Ser Met Ala Asn Asn
 370     375     380
His Met Ser Met Thr Asn Ser Gly Val Ser Met Thr Asn Thr Leu Ser
 385     390     395     400
Ser Met Leu Lys Gly Phe Ala Pro Ala Ala Ala Ala Gln Ala Val Gln
 405     410     415
Thr Ala Ala Gln Asn Gly Val Arg Ala Met Ser Ser Leu Gly Ser Ser
    
```

ES 2 744 676 T3

				420						425					430
Leu	Gly	Ser	Ser	Gly	Leu	Gly	Gly	Gly	Val	Ala	Ala	Asn	Leu	Gly	Arg
				435				440				445			
Ala	Ala	Ser	Val	Gly	Ser	Leu	Ser	Val	Pro	Gln	Ala	Trp	Ala	Ala	Ala
				450			455				460				
Asn	Gln	Ala	Val	Thr	Pro	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	Ser	Leu
465				470				475							480
Thr	Ser	Ala	Ala	Glu	Arg	Gly	Pro	Gly	Gln	Met	Leu	Gly	Gly	Leu	Pro
				485				490							495
Val	Gly	Gln	Met	Gly	Ala	Arg	Ala	Gly	Gly	Gly	Leu	Ser	Gly	Val	Leu
				500				505							510
Arg	Val	Pro	Pro	Arg	Pro	Tyr	Val	Met	Pro	His	Ser	Pro	Ala	Ala	Gly
				515				520				525			
Asp	Ile	Ala	Pro	Pro	Ala	Leu	Ser	Gln	Asp	Arg	Phe	Ala	Asp	Phe	Pro
530				535				540							
Ala	Leu	Pro	Leu	Asp	Pro	Ser	Ala	Met	Val	Ala	Gln	Val	Gly	Pro	Gln
545				550				555							560
Val	Val	Asn	Ile	Asn	Thr	Lys	Leu	Gly	Tyr	Asn	Asn	Ala	Val	Gly	Ala
				565				570							575
Gly	Thr	Gly	Ile	Val	Ile	Asp	Pro	Asn	Gly	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Asn
				580				585							590
His	Val	Ile	Ala	Gly	Ala	Thr	Asp	Ile	Asn	Ala	Phe	Ser	Val	Gly	Ser
				595				600							605
Gly	Gln	Thr	Tyr	Gly	Val	Asp	Val	Val	Gly	Tyr	Asp	Arg	Thr	Gln	Asp
				610				615				620			
Val	Ala	Val	Leu	Gln	Leu	Arg	Gly	Ala	Gly	Gly	Leu	Pro	Ser	Ala	Ala
625				630				635							640
Ile	Gly	Gly	Gly	Val	Ala	Val	Gly	Glu	Pro	Val	Val	Ala	Met	Gly	Asn
				645				650							655
Ser	Gly	Gly	Gln	Gly	Thr	Pro	Arg	Ala	Val	Pro	Gly	Arg	Val	Val	
				660				665							670
Ala	Leu	Gly	Gln	Thr	Val	Gln	Ala	Ser	Asp	Ser	Leu	Thr	Gly	Ala	Glu
				675				680							685
Glu	Thr	Leu	Asn	Gly	Leu	Ile	Gln	Phe	Asp	Ala	Ala	Ile	Gln	Pro	Gly
				690				695				700			
Asp	Ala	Gly	Gly	Pro	Val	Val	Asn	Gly	Leu	Gly	Gln	Val	Val	Gly	Met
705				710				715							720
Asn	Thr	Ala	Ala	Ser											
				725											

<210> 11
 <211> 1149
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> *Plasmodium falciparum*

<400> 11

10

```

atgatgagaa aacttgccat cctcagcgtc agctcttttc tgttcgtgga ggccctcttc 60
caggagtatc agtgctacgg aagcagcagc aatacaaggg tcctgaacga gctcaactat 120
gacaacgctg gaacgaacct gtataacgag ctggagatga actactatgg caagcaggag 180
aactggtata gcctgaagaa gaacagcggg tccctggggc agaacgacga cgggaacaac 240
aacaacggcg acaacggcag ggagggcaaa gatgaggaca agagggacgg gaacaacgag 300
gataacgaga agctgctggaa gcccaagcac aagaaactca agcagcccgc cgacgggaac 360
ccggacccca atgcaaatcc caacgtcgac ccaaacgcaa accctaactg ggaccccaac 420
gccaatccca acgtcgatcc taatgccaat ccaaatgcca accctaacgc aaatcctaata 480
gcaaacccca acgccaatcc taacgccaac ccaaatgcca acccaaacgc taaccccaac 540
gctaacccaa atgcaaatcc caatgctaac ccaaactggg accctaacgc taaccccaac 600
gcaaacccta acgccaatcc taacgccaac ccaaatgcaa acccaaacgc aaatcccaac 660
gctaacccta acgcaaaccc caacgccaac cctaactgcca accccaatgc taaccccaac 720
gccaatccaa acgcaaatcc aaacgccaac ccaaatgcaa accccaacgc taatcccaac 780

gccaacccea acgccaatcc taacaagaac aatcagggca acgggcaggg ccataacatg 840
ccgaacgacc ctaatcgga tgtggacgag aacgccaacg ccaacagcgc cgtgaagaac 900
aacaacaacg aggagccctc cgacaagcac atcaaggat acctgaacaa gatccagaac 960
agtctgagca ccgagtggtc cccctgctcc gtgacctgcg gcaacggcat ccaggtgagg 1020
atcaagcccg gctccgcca caagcccaag gacgagctgg actacgcca cgacatcgag 1080
aagaagatct gcaagatgga gaaatgcagc tctgtgttca acgtcgtgaa ctcgcgcatc 1140
ggcctgtga                                     1149
    
```

<210> 12
 <211> 382
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> *Plasmodium falciparum*

<400> 12

```

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

      Cys Ser Ser Val Phe Asn Val Val Asn Ser Ala Ile Gly Leu
      370      375      380
    
```

10

<210> 13
 <211> 1275
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Plasmodium falciparum*

<400> 13

5

```

atgatggctc ccgatcctaa tgcaaatcca aatgcaaacc caaacgcaaa ccccaatgca 60
aatcctaatag caaaccccaa tgcaaatcct aatgcaaacc ctaatgccaa tcccaatgca 120
aatcccaatg caaaccccaa cgcaaacccc aatgcaaacc ctaatgccaa tcccaatgca 180
aatcccaatg caaaccccaa tgcaaaccca aatgcaaacc ccaatgcaaa tcccaataaa 240
aacaatcaag gtaatggaca aggtcacaat atgccaatg acccaaaccg aaatgtagat 300
gaaaatgcta atgccaacag tgctgtaaaa aataataata acgaagaacc aagtgataag 360
cacataaaag aatatttaaa caaaatacaa aattctcttt caactgaatg gtccccatgt 420
agtgtaactt gtggaaatgg tattcaagtt agaataaagc ctggctctgc taataaacct 480
aaagacgaat tagattatgc aaatgatatt gaaaaaaaaa ttgtaaaat ggaaaaatgt 540
tccagtgtgt ttaatgtcgt aaatagttca ataggattag ggcctgtgac gaacatggag 600
aacatcacat caggattcct aggaccctcg ctctgtttac aggcggggtt tttcttgttg 660
acaagaatcc tcacaatacc gcagagtcta gactcgtggt ggacttctct caattttcta 720
gggggatcac cctgtgtgct tggccaaaat tcgcagtccc caacctcaa tcaactcaca 780
acctcctgtc ctccaatttg tcctggttat cgctggatgt gtctgcgggc ttttatcata 840
ttctcttca tcctgtgct atgcctcacc ttcttattgg ttcttctgga ttatcaaggt 900
atgttgcccg tttgtcctct aattccagga tcaacaacaa ccaatacggg accatgcaaa 960
acctgcacga ctctgtctca aggcaactct atgtttccct catgttgctg taaaaaacct 1020
acggatggaa attgcacctg tattcccatc ccctcgtcct gggctttcgc aaaataccta 1080
tgggagtggg cctcagtcctg tttctcttgg ctcaagttac tagtgccatt tgttcagtgg 1140
ttcgtagggc tttccccac tgtttggett tcagctatat ggatgatgtg gtattggggg 1200
ccaagtctgt acagcatcgt gagtcccttt ataccgctgt taccaatttt cttttgtctc 1260
tgggtataca ttttaa 1275
    
```

<210> 14

<211> 424

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Plasmodium falciparum*

<400> 14

10

15

```

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


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

5 <210> 15
 <211> 3411
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VIH
 10 <400> 15

ES 2 744 676 T3

atgggtcattg ttcagaacat acagggccaa atgggtccacc aggcaattag tccgogaact 60
 cttaatgcat ggggtgaaggt cgtggaggaa aaggcattct ccccgagggt cattccgatg 120
 ttttctgcgc tatctgaggg cgcaacgccg caagacctta ataccatgct taacacggta 180
 ggcgggcacc aagccgctat gcaaatgcta aaagagacta taaacgaaga ggccgcccga 240
 tgggatcgag tgcacccggg gcacgcccgc ccaattgcac caggccagat gcgagagccc 300
 cgccgggtctg atattgcagg aactacgtct acccttcagg agcagattgg gtggatgact 360
 aacaatccac caatcccggg cggagagatc tataagaggt ggatcatact gggactaaac 420
 aagatagtcc gcatgtattc tccgacttct atactggata tacgccaagg cccaaggag 480
 ccgttcaggg actatgtcga ccgattctat aagacccttc gcgcagagca ggcattcccag 540
 gaggcaaaa attggatgac agaaactctt ttgggtgcaga atgcgaatcc ggattgtaaa 600
 acaattttaa aggctctagg accggccgca acgctagaag agatgatgac ggcttgtcag 660
 ggagtccggtg gaccggggca taaagcccgc gtcttacaca tgggcccgat atctccgata 720
 gaaacagttt cgggtcaagct taaaccaggg atggatggtc caaaggtaaa gcagtggccg 780
 ctaacggaag agaagattaa ggcgctcgta gagatttcta ctgaaatgga gaaggagggc 840
 aagataagca agatcggggc agagaaccgg tacaatacac cggatatttc aataaagaaa 900
 aaggattcaa caaatggcg aaagcttcta gatttttaggg aactaataaa gcgaacccaa 960

gacttttggg aagtccaact agggatccca catccagccg gtctaagaa gaagaaatcg 1020
 gtcacagtcc tggatgtagg agaogcatat tttagtgtac cgcttgatga ggacttccga 1080
 aagtatactg cgtttactat accgagcata aacaatgaaa cgccaggcat tcgctatcag 1140
 tacaacgtgc tcccgcaggg ctggaagggg tctccggcga tatttcagag ctgtatgaca 1200
 aaaatacttg aaccattccg aaagcagaat ccggatattg taatttacca atacatggac 1260
 gatctctatg tgggctcgga tctagaaatt gggcagcatc gcactaagat tgaggaaactg 1320
 aggcaacatc tgcttcgatg gggcctcact actcccgaca agaagcacca gaaggagccg 1380
 ccgctcctaa agatgggcta cgagcttcat ccggacaagt ggacagtaca gccgatagtg 1440
 ctgcccgaaa aggattcttg gaccgtaaat gatattcaga aactagtccg caagcttaac 1500
 tgggctctc agatttacc aggcattaag gtcogacagc tttgcaagct actgagggga 1560
 actaaggctc taacagaggt catcccatta acggaggaag cagagcttga gctggcagag 1620
 aatcgcgaaa ttcttaagga gcgggtgcac ggggtatact acgaccctc caaggacott 1680
 atagccagga tccagaagca ggggcagggc caatggacgt accagatata tcaagaacct 1740
 ttttaagaatc tgaagactg gaagctcagc cgcacggag gggctcatic taatggatga 1800
 aagcaactta cggaagcagt acaaaagatt actactgagt ctatttgtat atggggcaag 1860
 accccaaagt tcaagctgcc catacagaag gaaacatggg aaacatgggt gactgaatat 1920
 tggcaagcta cctggattcc agaatgggaa tttgtcaaca cgccgccact tgtaagctt 1980
 tggtaaccagc ttgaaaagga gccgatagta gggcagaga ccttctatgt cgatggcgcc 2040
 gcgaatcgcg aaacgaagct aggcaaggcg ggatacgtga ctaatagggg ccgccaaaa 2100
 gtcgtaacc ttacggatac caccaatcag aagactgaac tacaagcgt taccttgca 2160
 cttcaggata ttggcctaga ggtcaacata gtcacggact ctcaatatgc taatggcatt 2220
 attcaagcgc agccagatca aagcgaagc gagctttaa accaaataat agaacagctt 2280
 ataaagaaag agaaggtata tctggcctgg gtccccgctc acaagggaaat tggcggcaat 2340
 gagcaagtgg acaagctagt cagcgtgagg attogcaagg ttcttgatg ggggggtaag 2400
 tggctaaagt ctagcgtagt cggctggccg acagtcggcg agcgcagtcg acgcccga 2460
 ccagccgag atggcgtggg ggcagcgtct agggatctgg agaagcacgg ggcataaact 2520
 tccagtaaca cggcggcgac gaacgcgca tccgcatggg tagaagccca agaagaggaa 2580
 gaagtgggt ttccggtaac tcccaggtg ccgttaaggc cgatgaccta taaggcagcg 2640
 gtggatctt ctacttctc taaggagaaa ggggggctgg agggcttaac tcacagccag 2700
 aggcgacagg atattctga tctgtggatt taccataacc aggggtactt tccggactgg 2760
 cagaattaca ccccggggac aggcgtgcgc tatccctga ctttcgggtg gtgctacaaa 2820
 ctagtcccag tggaaaccga caaggtcgaa gaggctaata agggcgagaa cacttctctt 2880
 cttcaccccg taagcctgca cgggatggat gaccagaac gagaggttct agaatggagg 2940
 ttcgactctc gacttgcgtt ccatacagta gcacgcgagc tgcattcaga atatttcaag 3000
 aactgcggcc caatggcgcc cagggccagt gtacttagtg gcggagaact agatcgatgg 3060
 gaaaagatac gcctacgccc ggggggcaag aagaagtaca agcttaagca cattgtgtgg 3120
 gcctctcgcg aacttgagcg attogcagtg aatccaggcc tgcttgagac gactgaaggc 3180
 ttagggcaaa ttctggggca gctacagccg agcctacaga ctggcagcga ggagcttctg 3240
 agtctttata ataccgtcgc gactctctac tgcgttcac aacgaattga aataaggat 3300
 actaaagagg cccttgataa aattgaggag gaacagaata agtcgaaaaa gaaggcccag 3360
 caggccgccc ccgacaccgg gcacagcaac caggtgtccc aaaactacta a 3411

- <210> 16
- <211> 1136
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 744 676 T3

<220>

<223> VIH

<400> 16

```

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

```

5

ES 2 744 676 T3

Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu
100 105 110
Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly
115 120 125
Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg
130 135 140
Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu
145 150 155 160
Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu
165 170 175
Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val
180 185 190
Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro
195 200 205
Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly
210 215 220
Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu His Met Gly Pro Ile Ser Pro Ile
225 230 235 240
Glu Thr Val Ser Val Lys Leu Lys Pro Gly Met Asp Gly Pro Lys Val
245 250 255
Lys Gln Trp Pro Leu Thr Glu Glu Lys Ile Lys Ala Leu Val Glu Ile
260 265 270
Cys Thr Glu Met Glu Lys Glu Gly Lys Ile Ser Lys Ile Gly Pro Glu
275 280 285
Asn Pro Tyr Asn Thr Pro Val Phe Ala Ile Lys Lys Lys Asp Ser Thr
290 295 300
Lys Trp Arg Lys Leu Val Asp Phe Arg Glu Leu Asn Lys Arg Thr Gln
305 310 315 320
Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu Gly Ile Pro His Pro Ala Gly Leu Lys
325 330 335
Lys Lys Lys Ser Val Thr Val Leu Asp Val Gly Asp Ala Tyr Phe Ser
340 345 350
Val Pro Leu Asp Glu Asp Phe Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro
355 360 365
Ser Ile Asn Asn Glu Thr Pro Gly Ile Arg Tyr Gln Tyr Asn Val Leu
370 375 380
Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro Ala Ile Phe Gln Ser Cys Met Thr
385 390 395 400
Lys Ile Leu Glu Pro Phe Arg Lys Gln Asn Pro Asp Ile Val Ile Tyr
405 410 415
Gln Tyr Met Asp Asp Leu Tyr Val Gly Ser Asp Leu Glu Ile Gly Gln
420 425 430
His Arg Thr Lys Ile Glu Glu Leu Arg Gln His Leu Leu Arg Trp Gly
435 440 445
Leu Thr Thr Pro Asp Lys Lys His Gln Lys Glu Pro Pro Phe Leu Lys
450 455 460
Met Gly Tyr Glu Leu His Pro Asp Lys Trp Thr Val Gln Pro Ile Val
465 470 475 480
Leu Pro Glu Lys Asp Ser Trp Thr Val Asn Asp Ile Gln Lys Leu Val
485 490 495
Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln Ile Tyr Pro Gly Ile Lys Val Arg
500 505 510
Gln Leu Cys Lys Leu Leu Arg Gly Thr Lys Ala Leu Thr Glu Val Ile
515 520 525
Pro Leu Thr Glu Glu Ala Glu Leu Glu Leu Ala Glu Asn Arg Glu Ile
530 535 540
Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr Tyr Asp Pro Ser Lys Asp Leu
545 550 555 560
Ile Ala Glu Ile Gln Lys Gln Gly Gln Gly Gln Trp Thr Tyr Gln Ile
565 570 575
Tyr Gln Glu Pro Phe Lys Asn Leu Lys Thr Gly Lys Tyr Ala Arg Met
580 585 590
Arg Gly Ala His Thr Asn Asp Val Lys Gln Leu Thr Glu Ala Val Gln

ES 2 744 676 T3

		595					600					605			
Lys	Ile	Thr	Thr	Glu	Ser	Ile	Val	Ile	Trp	Gly	Lys	Thr	Pro	Lys	Phe
	610					615					620				
Lys	Leu	Pro	Ile	Gln	Lys	Glu	Thr	Trp	Glu	Thr	Trp	Trp	Thr	Glu	Tyr
	625				630						635				640
Trp	Gln	Ala	Thr	Trp	Ile	Pro	Glu	Trp	Glu	Phe	Val	Asn	Thr	Pro	Pro
				645					650				655		
Leu	Val	Lys	Leu	Trp	Tyr	Gln	Leu	Glu	Lys	Glu	Pro	Ile	Val	Gly	Ala
		660						665					670		
Glu	Thr	Phe	Tyr	Val	Asp	Gly	Ala	Ala	Asn	Arg	Glu	Thr	Lys	Leu	Gly
		675				680						685			
Lys	Ala	Gly	Tyr	Val	Thr	Asn	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Val	Val	Thr	Leu
	690					695					700				
Thr	Asp	Thr	Thr	Asn	Gln	Lys	Thr	Glu	Leu	Gln	Ala	Ile	Tyr	Leu	Ala
	705				710					715					720
Leu	Gln	Asp	Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Asn	Ile	Val	Thr	Asp	Ser	Gln	Tyr
				725					730					735	
Ala	Leu	Gly	Ile	Ile	Gln	Ala	Gln	Pro	Asp	Gln	Ser	Glu	Ser	Glu	Leu
		740				745						750			
Val	Asn	Gln	Ile	Ile	Glu	Gln	Leu	Ile	Lys	Lys	Glu	Lys	Val	Tyr	Leu
		755				760						765			
Ala	Trp	Val	Pro	Ala	His	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Asn	Glu	Gln	Val	Asp
	770					775					780				
Lys	Leu	Val	Ser	Ala	Gly	Ile	Arg	Lys	Val	Leu	Ala	Met	Gly	Gly	Lys
	785				790					795					800
Trp	Ser	Lys	Ser	Ser	Val	Val	Gly	Trp	Pro	Thr	Val	Arg	Glu	Arg	Met
				805					810					815	
Arg	Arg	Ala	Glu	Pro	Ala	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ala	Ala	Ser	Arg	Asp
			820					825					830		
Leu	Glu	Lys	His	Gly	Ala	Ile	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Ala	Thr	Asn
		835					840					845			
Ala	Ala	Cys	Ala	Trp	Leu	Glu	Ala	Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Gly	Phe
	850					855						860			
Pro	Val	Thr	Pro	Gln	Val	Pro	Leu	Arg	Pro	Met	Thr	Tyr	Lys	Ala	Ala
	865				870					875					880
Val	Asp	Leu	Ser	His	Phe	Leu	Lys	Glu	Lys	Gly	Gly	Leu	Glu	Gly	Leu
				885					890					895	
Ile	His	Ser	Gln	Arg	Arg	Gln	Asp	Ile	Leu	Asp	Leu	Trp	Ile	Tyr	His
			900					905					910		
Thr	Gln	Gly	Tyr	Phe	Pro	Asp	Trp	Gln	Asn	Tyr	Thr	Pro	Gly	Pro	Gly
		915				920						925			
Val	Arg	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Trp	Cys	Tyr	Lys	Leu	Val	Pro	Val
	930					935					940				
Glu	Pro	Asp	Lys	Val	Glu	Ala	Asn	Lys	Gly	Glu	Asn	Thr	Ser	Leu	
	945				950					955				960	
Leu	His	Pro	Val	Ser	Leu	His	Gly	Met	Asp	Asp	Pro	Glu	Arg	Glu	Val
				965					970					975	
Leu	Glu	Trp	Arg	Phe	Asp	Ser	Arg	Leu	Ala	Phe	His	His	Val	Ala	Arg
			980					985					990		
Glu	Leu	His	Pro	Glu	Tyr	Phe	Lys	Asn	Cys	Arg	Pro	Met	Gly	Ala	Arg
		995					1000					1005			
Ala	Ser	Val	Leu	Ser	Gly	Gly	Glu	Leu	Asp	Arg	Trp	Glu	Lys	Ile	Arg
	1010					1015						1020			
Leu	Arg	Pro	Gly	Gly	Lys	Lys	Lys	Tyr	Lys	Leu	Lys	His	Ile	Val	Trp
	1025				1030						1035				1040
Ala	Ser	Arg	Glu	Leu	Glu	Arg	Phe	Ala	Val	Asn	Pro	Gly	Leu	Leu	Glu
				1045					1050					1055	
Thr	Ser	Glu	Gly	Cys	Arg	Gln	Ile	Leu	Gly	Gln	Leu	Gln	Pro	Ser	Leu
			1060					1065					1070		
Gln	Thr	Gly	Ser	Glu	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Tyr	Asn	Thr	Val	Ala	Thr
		1075					1080						1085		
Leu	Tyr	Cys	Val	His	Gln	Arg	Ile	Glu	Ile	Lys	Asp	Thr	Lys	Glu	Ala
	1090					1095						1100			

ES 2 744 676 T3

Leu	Asp	Lys	Ile	Glu	Glu	Glu	Gln	Asn	Lys	Ser	Lys	Lys	Lys	Ala	Gln
1105					1110				1115						1120
Gln	Ala	Ala	Ala	Asp	Thr	Gly	His	Ser	Asn	Gln	Val	Ser	Gln	Asn	Tyr
				1125					1130						1135

REIVINDICACIONES

1. Uno o más primeros polipéptidos inmunógenos para su uso en un procedimiento de generación de una respuesta inmunológica frente a *Mycobacterium spp.*, en los que los uno o más primeros polipéptidos inmunógenos se administran de manera concomitante con (i) uno o más vectores adenovirales que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más segundos polipéptidos inmunógenos y (ii) un adyuvante que comprende QS21 y 3D-MPL, en el que los uno o más primeros y segundos polipéptidos comprenden los restos 4-725 de la SEQ ID NO: 10, y en los que la expresión “de manera concomitante” significa que los uno o más polipéptidos inmunógenos, los uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran dentro de un período de no más de 12 horas, por ejemplo, dentro de un período de no más de 1 hora, normalmente en una ocasión, por ejemplo, en el transcurso de la misma visita al profesional sanitario, por ejemplo, los uno o más polipéptidos inmunógenos, los uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran de manera secuencial o de manera simultánea.
2. Uno o más vectores adenovirales que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más segundos polipéptidos inmunógenos derivados de *Mycobacterium spp.* para su uso en un procedimiento de generación de una respuesta inmunológica frente a dicho *Mycobacterium spp.* en los que los uno o más vectores adenovirales se administran de manera concomitante con (i) uno o más primeros polipéptidos inmunógenos derivados de dicha *Mycobacterium spp.* y (ii) un adyuvante que comprende QS21 y 2D-MPL, en el que los uno o más primeros y segundos polipéptidos comprenden los restos 4-725 de la SEQ ID NO: 10, y en el que la expresión “de manera concomitante” significa que los uno o más polipéptidos inmunógenos, los uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran dentro de un período de no más de 12 horas, por ejemplo, dentro de un período de no más de 1 hora, normalmente en una ocasión, por ejemplo, en el transcurso de la misma visita al profesional sanitario, por ejemplo, los uno o más polipéptidos inmunógenos, los uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran de manera secuencial o de manera simultánea.
3. Los uno o más primeros polipéptidos inmunógenos para su uso, o los uno o más vectores adenovirales para su uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en los que los uno o más primeros polipéptidos inmunógenos se formulan conjuntamente con el adyuvante.
4. Los uno o más primeros polipéptidos inmunógenos para su uso, o los uno o más vectores adenovirales para su uso, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en los que el procedimiento de generación de una respuesta inmunológica frente a *Mycobacterium spp.* consiste en (a) administrar de manera concomitante (i) dichos uno o más primeros polipéptidos inmunógenos; (ii) dichos uno o más vectores adenovirales; y (iii) un adyuvante; y (b) repetir de manera opcional las etapas de (a) en una segunda ocasión, y en la que la expresión “de manera concomitante” significa que los uno o más polipéptidos inmunógenos, los uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran dentro de un período de tiempo de no más de 12 horas, por ejemplo, dentro de un período de no más de 1 hora, normalmente en una ocasión, por ejemplo, en el transcurso de la misma visita al profesional sanitario, por ejemplo, los uno o más polipéptidos inmunógenos, los uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran de manera secuencial o de manera simultánea.
5. Los uno o más primeros polipéptidos inmunógenos para su uso, o los uno o más vectores adenovirales para su uso, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en los que el procedimiento de generación de una respuesta inmunológica frente a *Mycobacterium spp.* no implica administrar ninguna dosis de sensibilización de polipéptido inmunógeno o de polinucleótido que codifica el polipéptido inmunógeno.
6. Los uno o más primeros polipéptidos inmunógenos para su uso, o los uno o más vectores adenovirales para su uso, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en los que los uno o más primeros polipéptidos inmunógenos, los uno o más vectores adenovirales y un adyuvante se formulan conjuntamente.
7. Los uno o más primeros polipéptidos inmunógenos para su uso, o los uno o más vectores adenovirales para su uso, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en los que los uno o más primeros polipéptidos inmunógenos, los uno o más vectores adenovirales y el adyuvante no se formulan conjuntamente y se administran mediante diferentes vías de administración.
8. Una composición de vacuna que comprende (i) uno o más primeros polipéptidos inmunógenos derivados de *Mycobacterium spp.*; (ii) uno o más vectores adenovirales que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más segundos polipéptidos inmunógenos derivados de *Mycobacterium spp.*; y (iii) un adyuvante que comprende QS21 y 3D-MPL, en la que los uno o más primeros y segundos polipéptidos comprenden los restos 4-725 de la SEQ ID NO: 10.
9. Un kit que comprende (i) uno o más primeros polipéptidos inmunógenos derivados de *Mycobacterium spp.*; (ii) uno o más vectores adenovirales que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más segundos polipéptidos inmunógenos derivados de dicha *Mycobacterium spp.*; y (iii) un adyuvante que comprende QS21 y 3D-MPL, en el que los uno o más primeros y segundos polipéptidos comprenden los restos 4-725 de la SEQ ID NO: 10, y en el que los uno o más polipéptidos inmunógenos, los uno o más vectores adenovirales y el adyuvante son para la administración de manera concomitante, en la que la expresión “de manera concomitante” significa que

los uno o más polipéptidos inmunógenos, los uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran dentro de un período de no más de 12 horas, por ejemplo, en un período de no más de 1 hora, normalmente en una ocasión, por ejemplo, en el transcurso de la misma visita al profesional sanitario, por ejemplo, los uno o más polipéptidos inmunógenos, los uno o más vectores adenovirales y el adyuvante se administran de manera secuencial o de manera simultánea.

5 10. Los uno o más primeros polipéptidos inmunógenos para su uso, los uno o más vectores adenovirales para su uso, la composición de vacuna o el kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en los que la *Mycobacterium spp.* es *Mycobacterium tuberculosis*.

10 11. Los uno o más primeros polipéptidos inmunógenos para su uso, los uno o más vectores adenovirales para su uso, la composición de vacuna o el kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en los que uno o más de los vectores adenovirales deriva de un adenovirus de primate no humano.

12. Los uno o más primeros polipéptidos inmunógenos para su uso, los uno o más vectores adenovirales para su uso, la composición de vacuna o el kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en los que el adyuvante contiene liposomas.

15

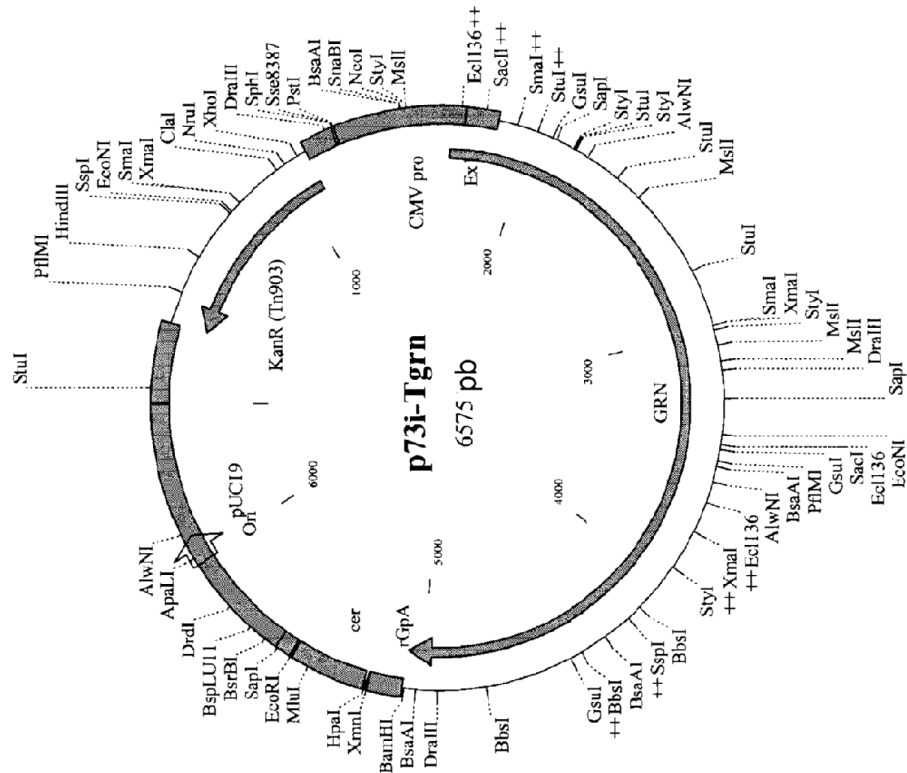
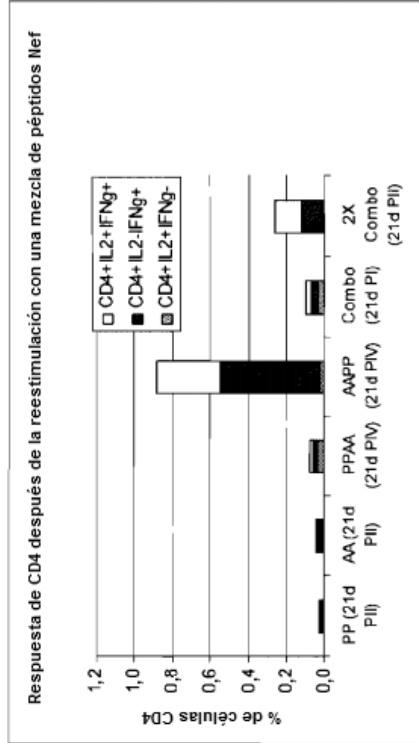


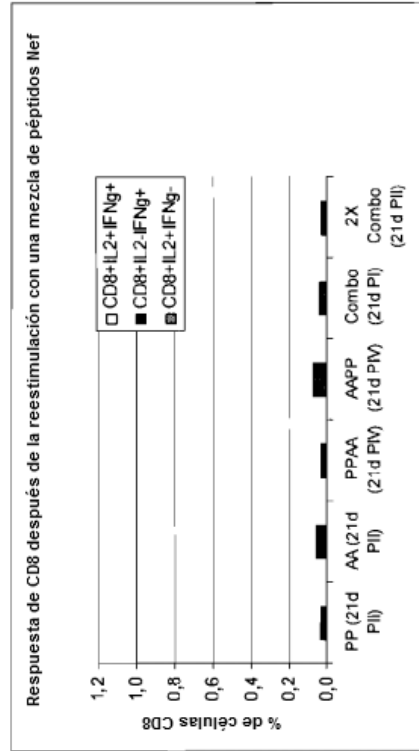
Figura 1

Figura 2a

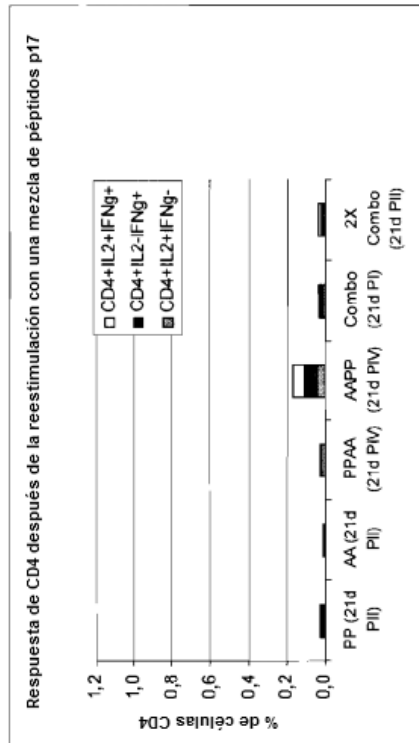
Respuesta de CD4



Respuesta de CD8



Respuesta de CD4 después de la reestimulación con una mezcla de péptidos p17



Respuesta de CD8 después de la reestimulación con una mezcla de péptidos p17

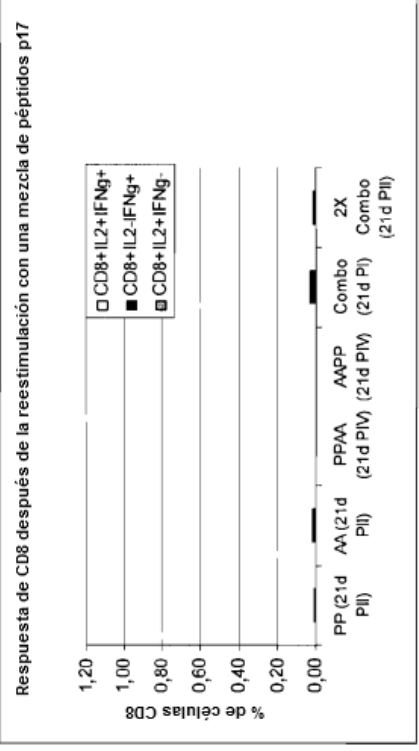
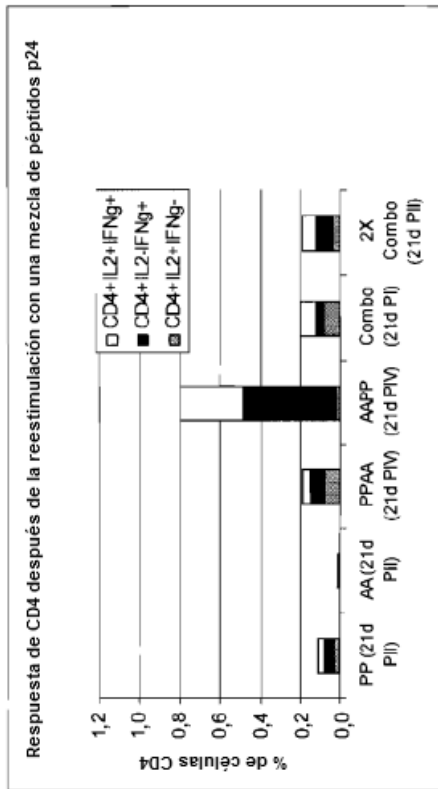
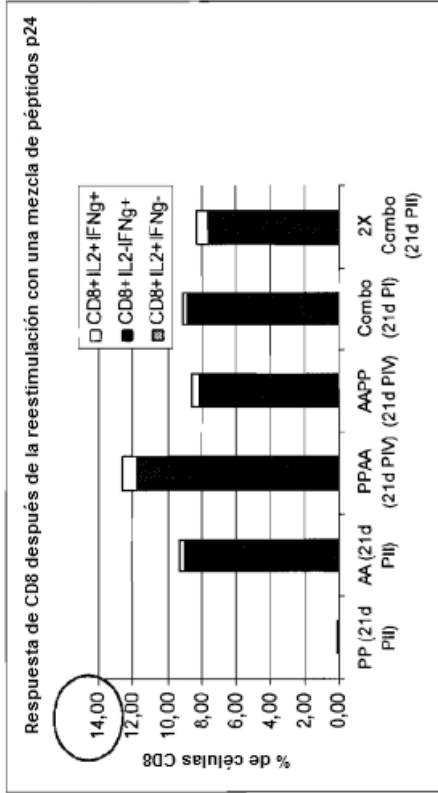


Figura 2b

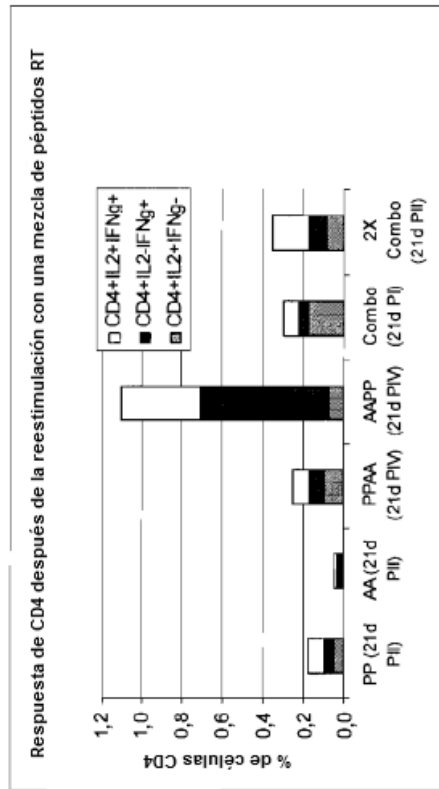
Respuesta de CD4



Respuesta de CD8



Respuesta de CD4 después de la reestimulación con una mezcla de péptidos RT



Respuesta de CD8 después de la reestimulación con una mezcla de péptidos RT

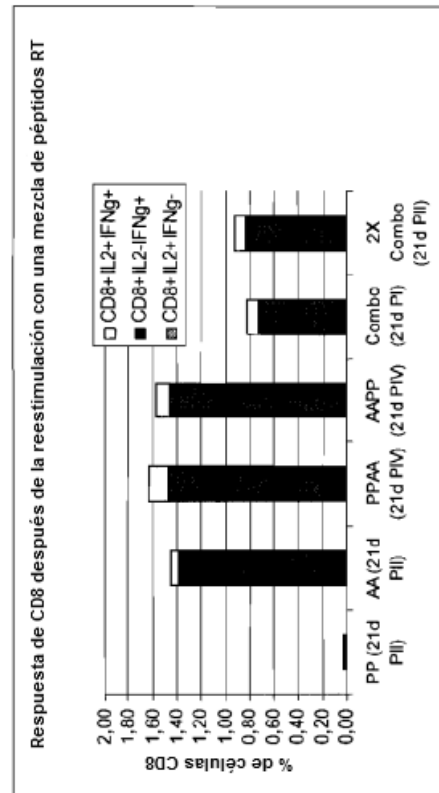


Figura 4

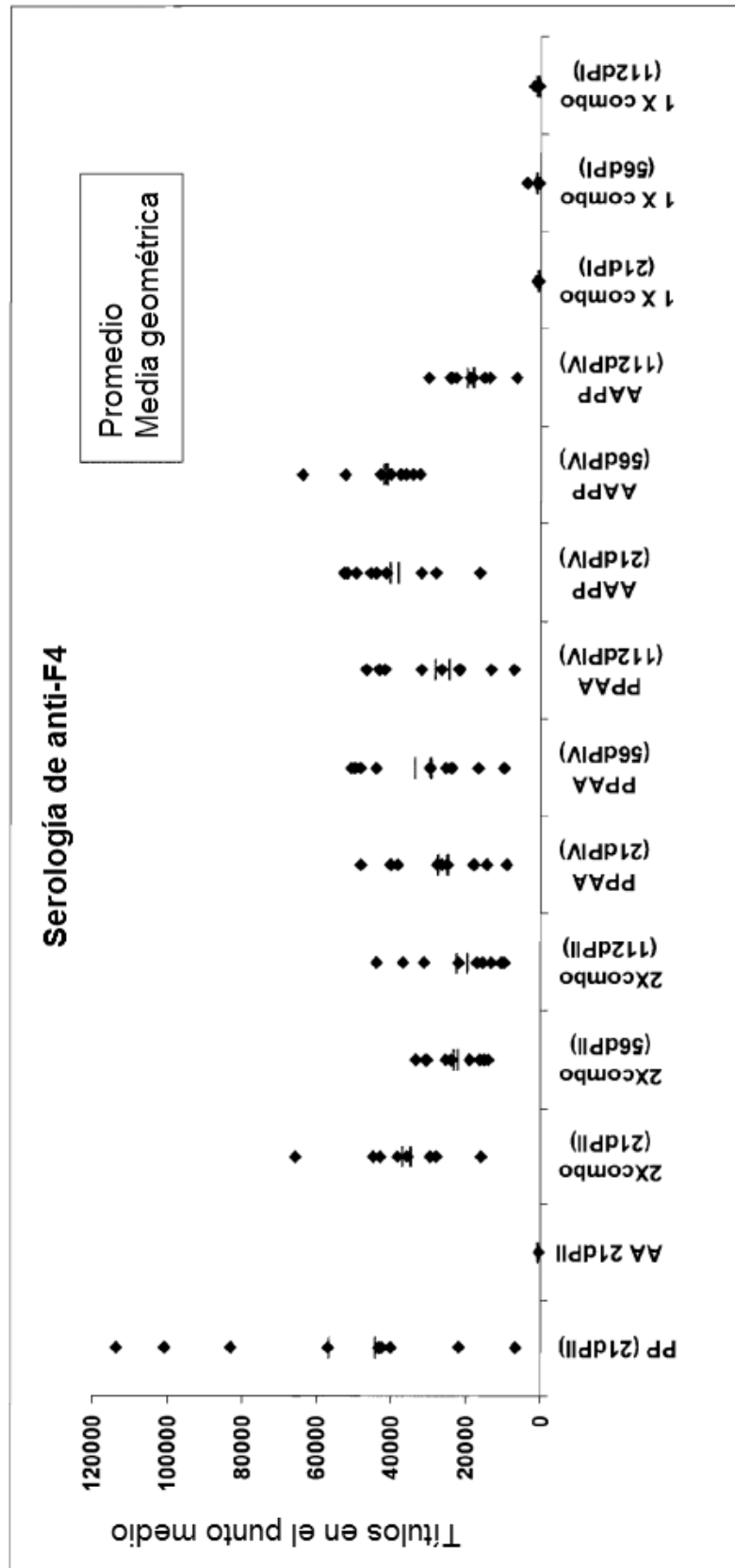
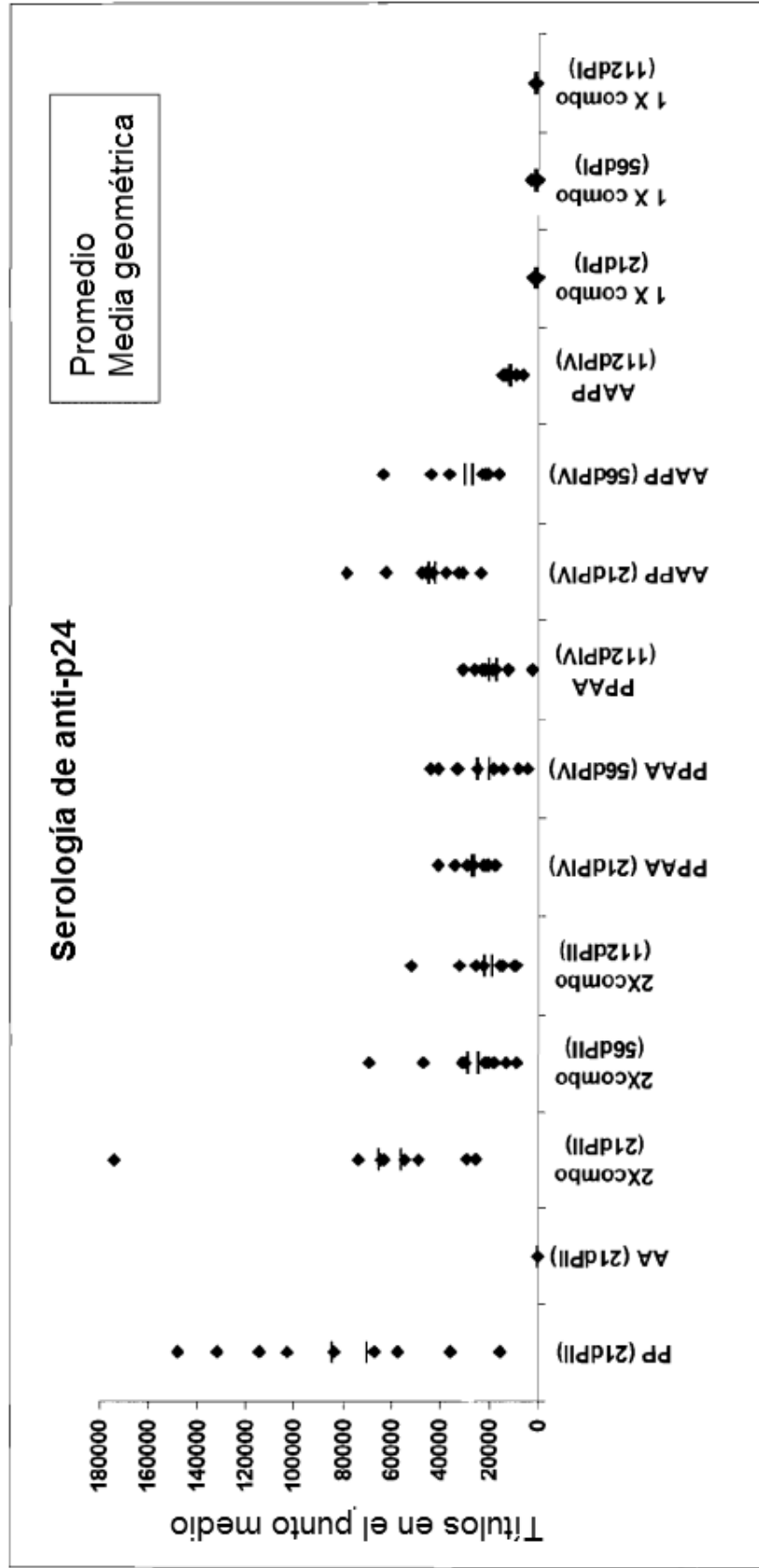


Figura 5



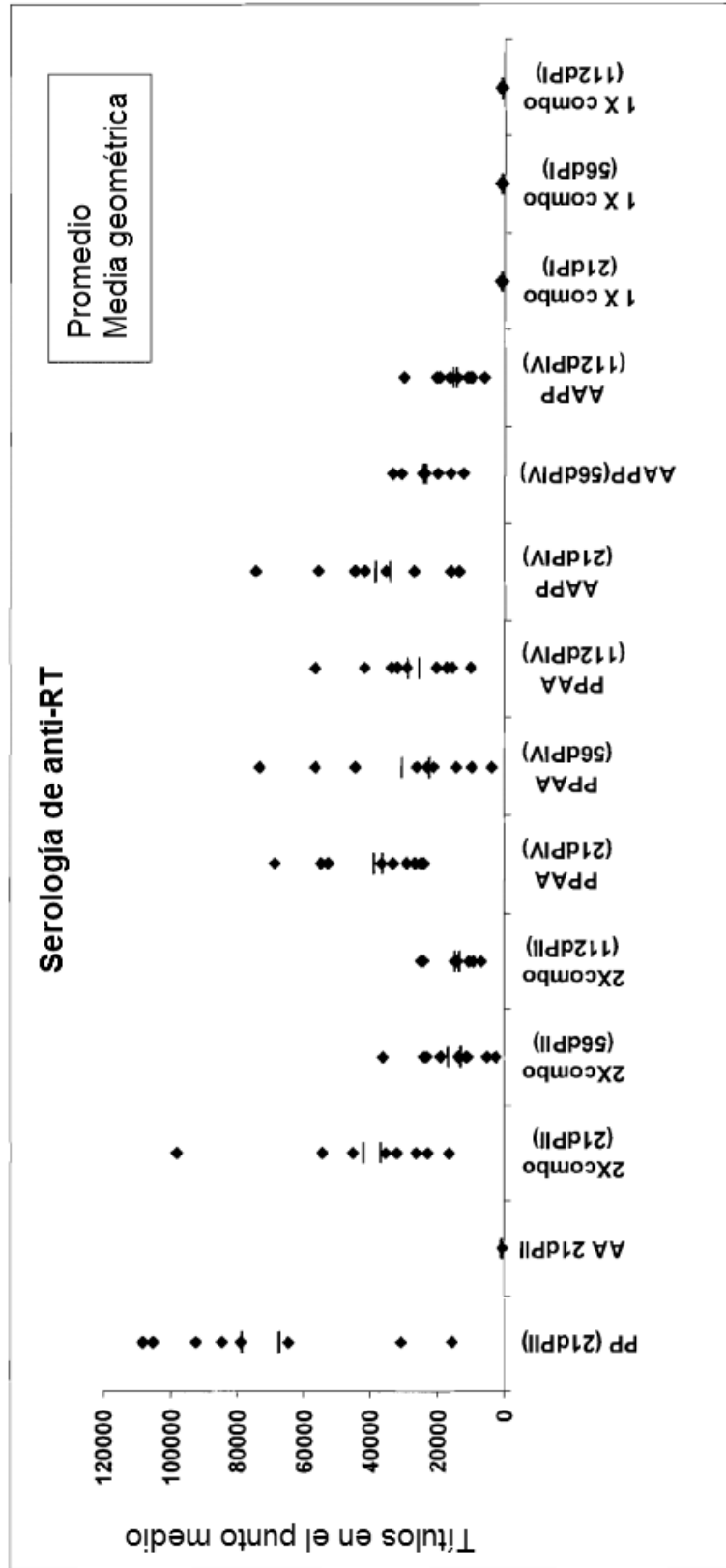


Figura 6

Figura 7

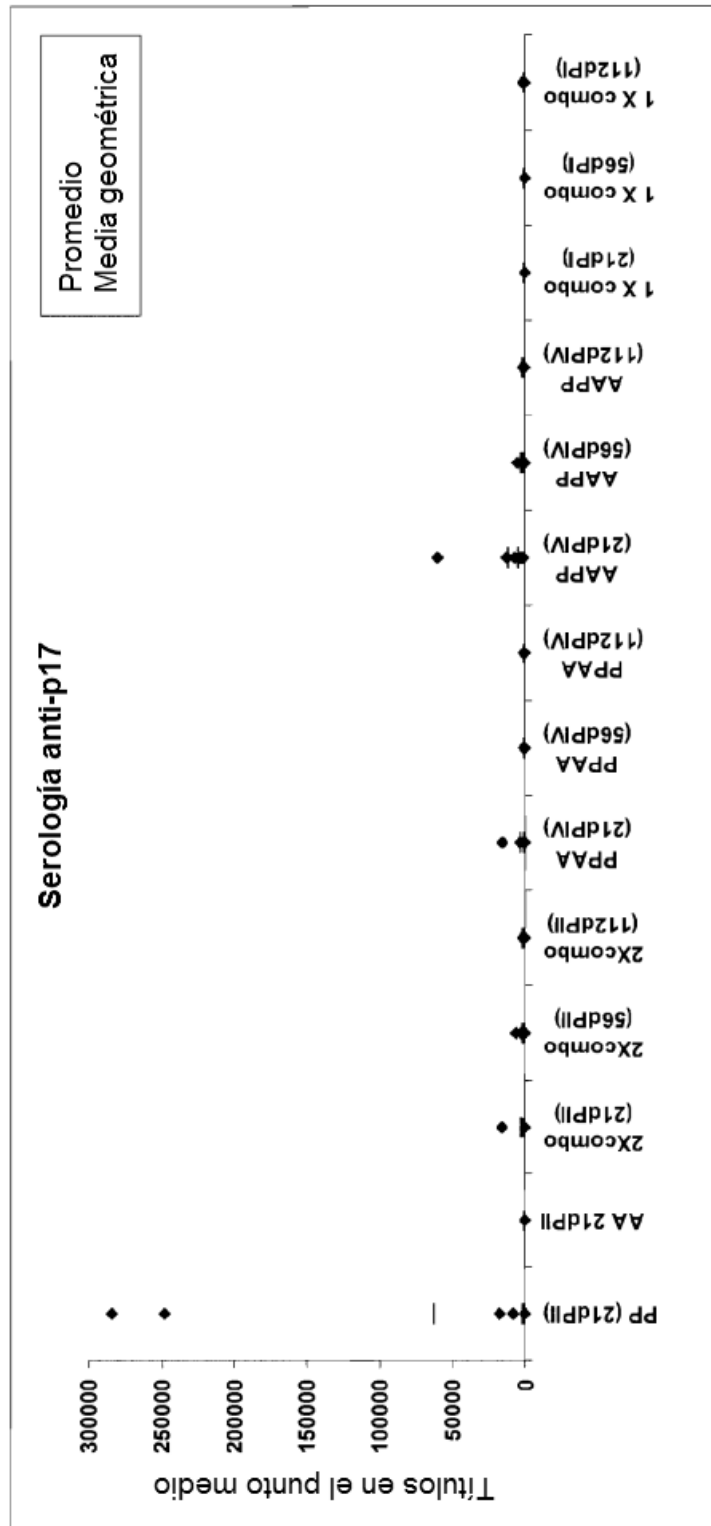


Figura 8

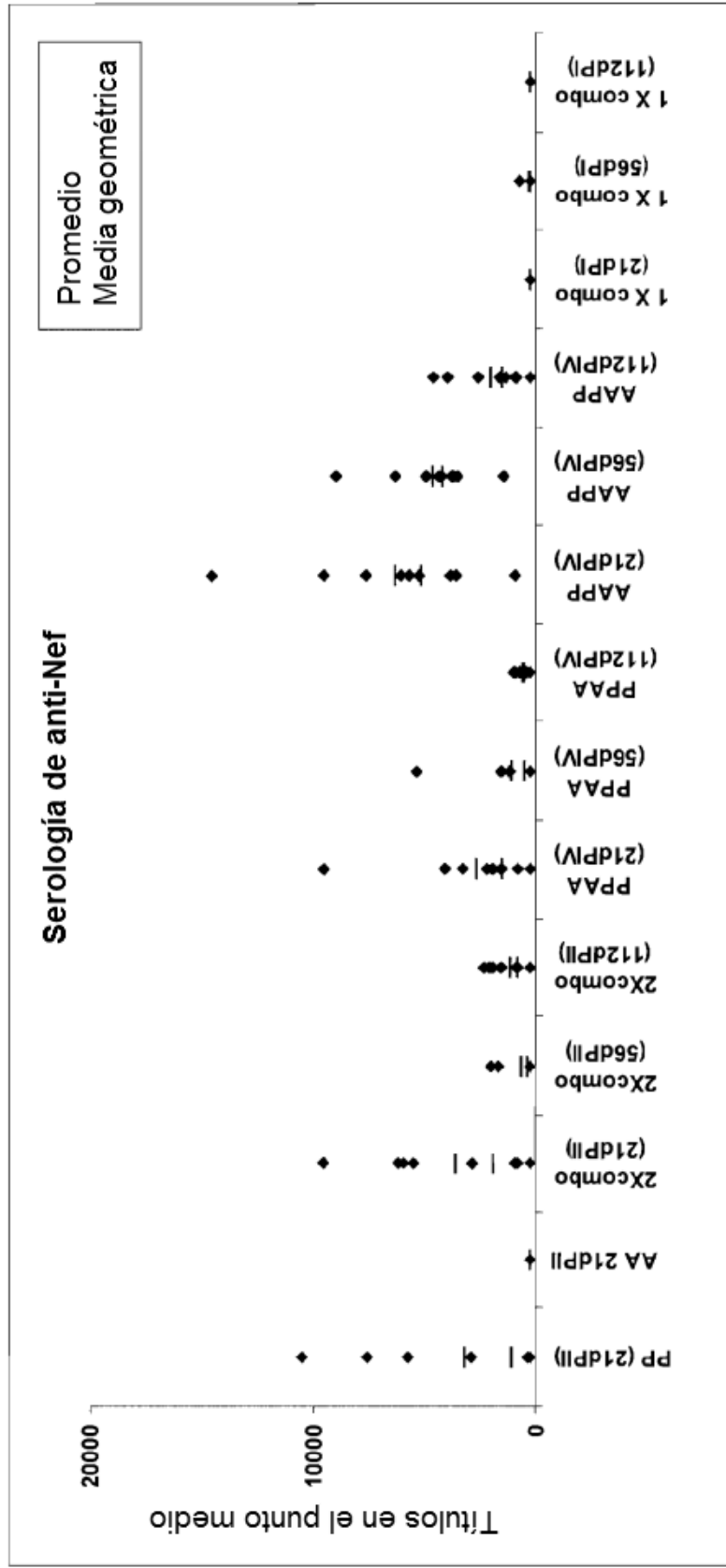


Figura 9

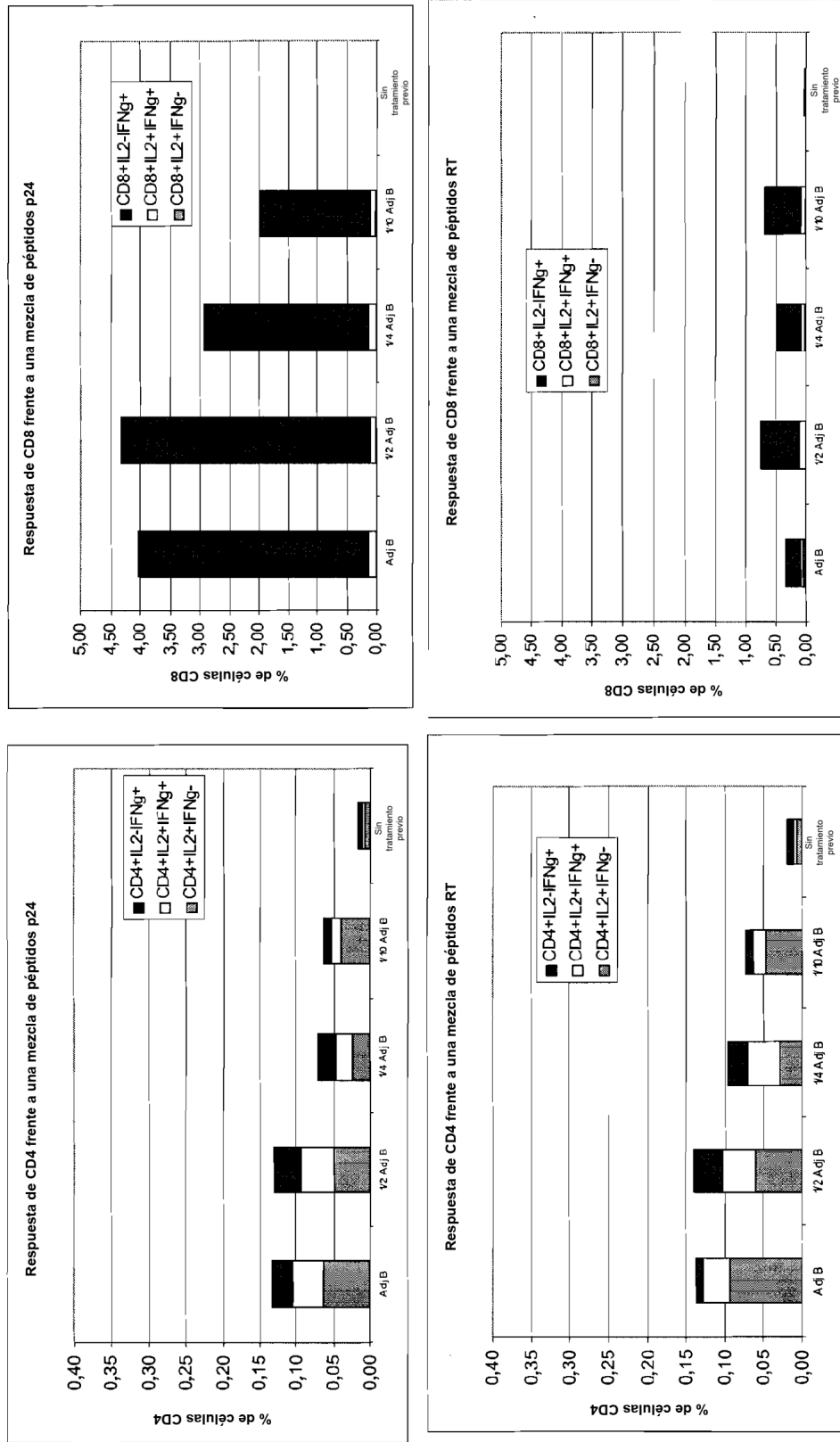


Figura 10

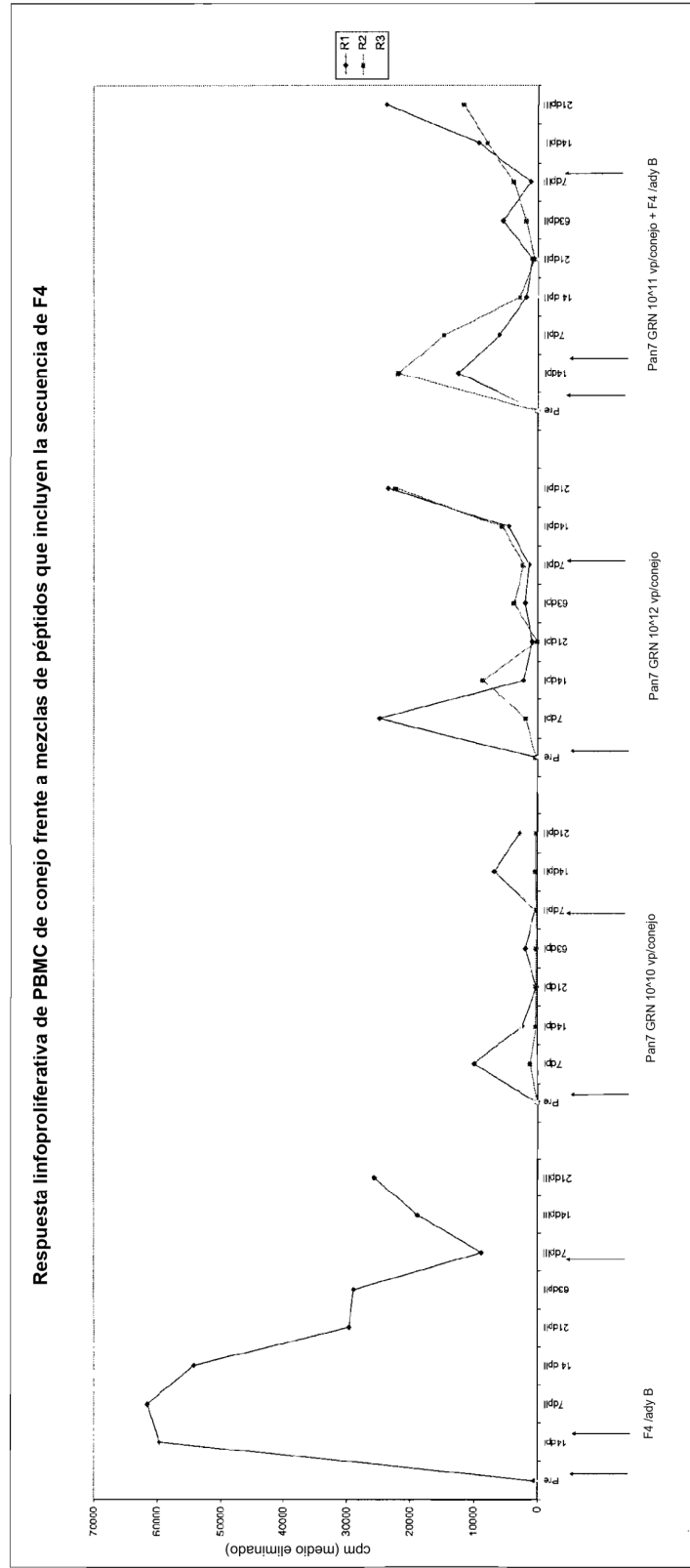


Figura 11

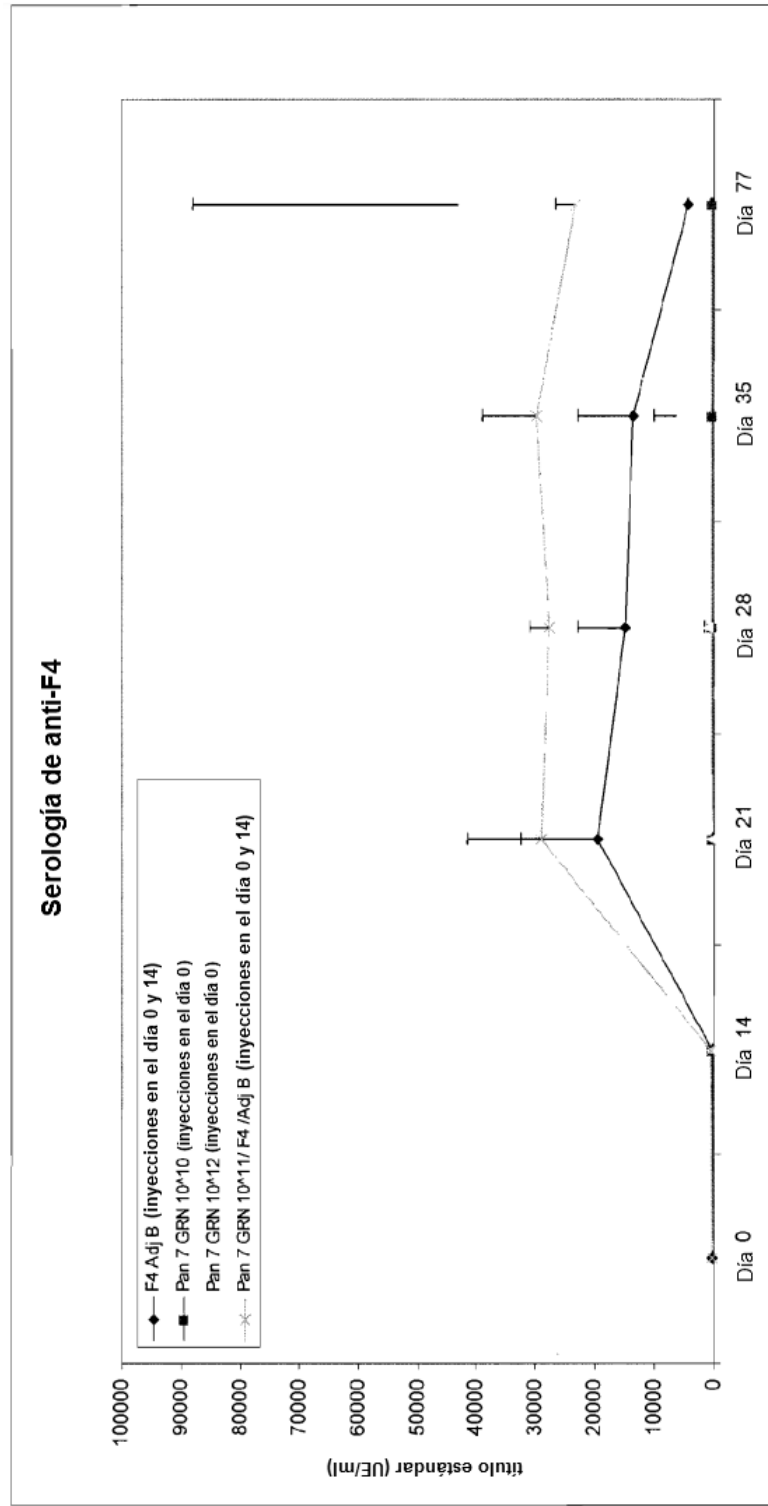


Figura 12a

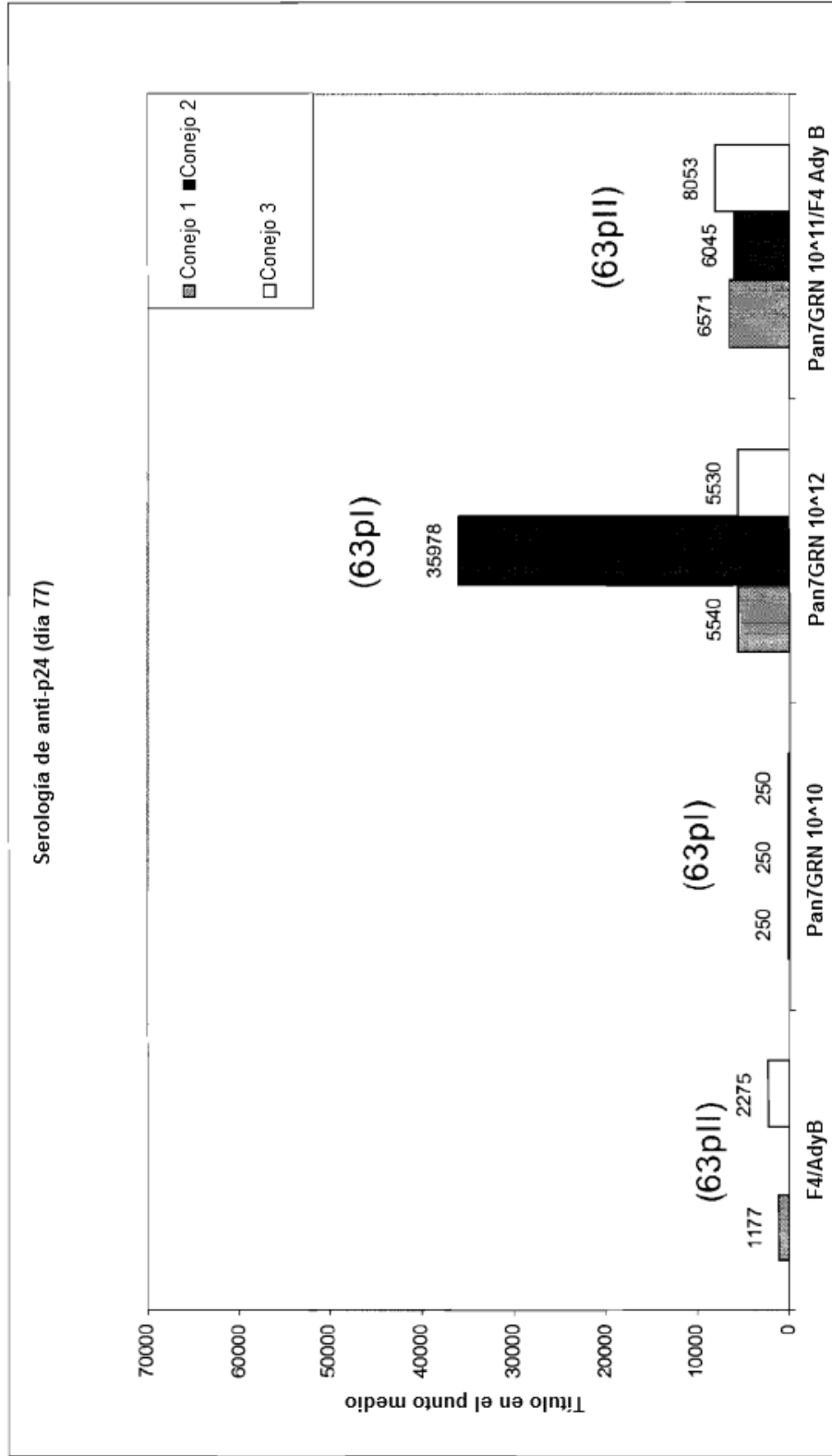


Figura 12b

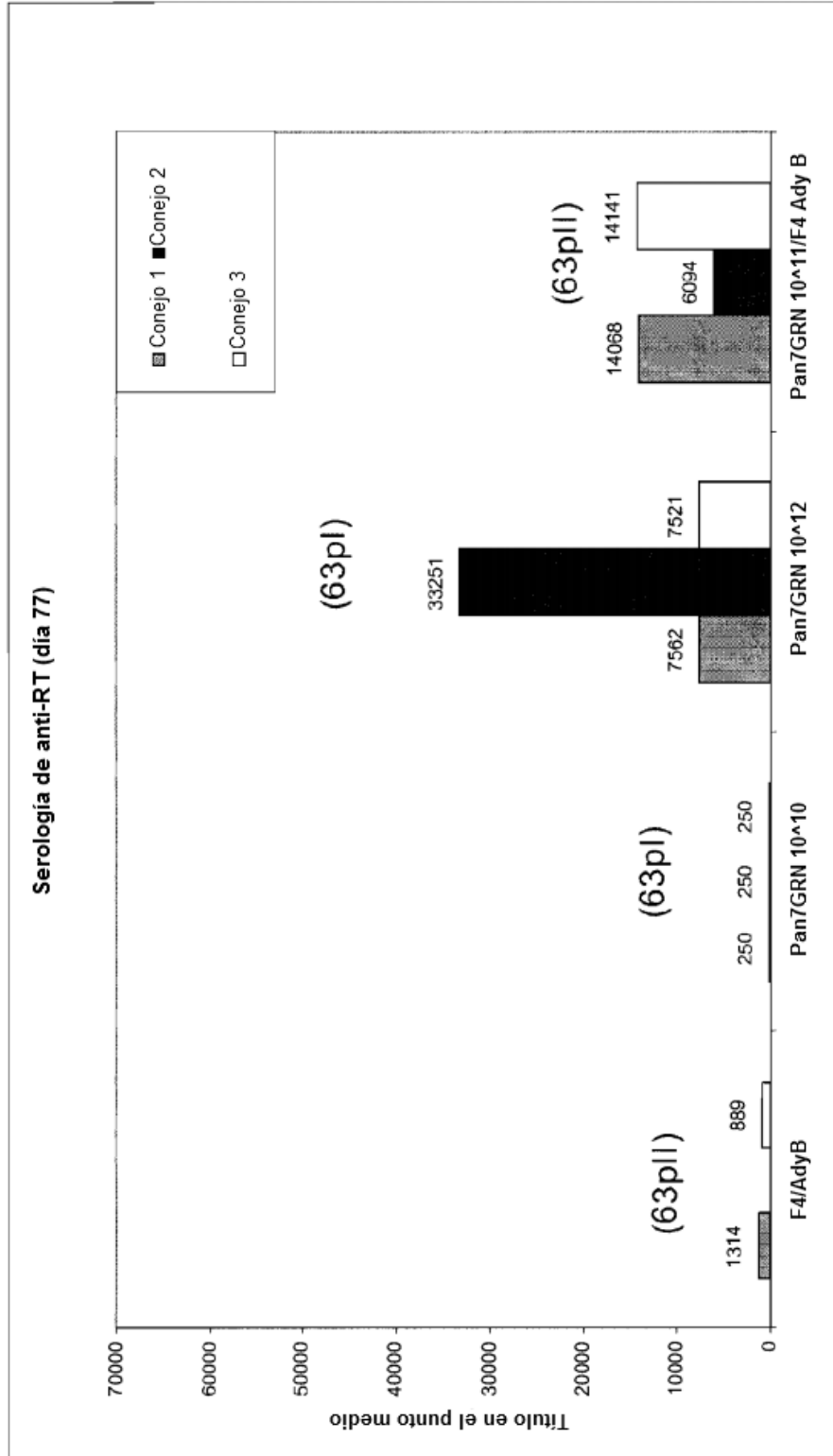


Figura 13

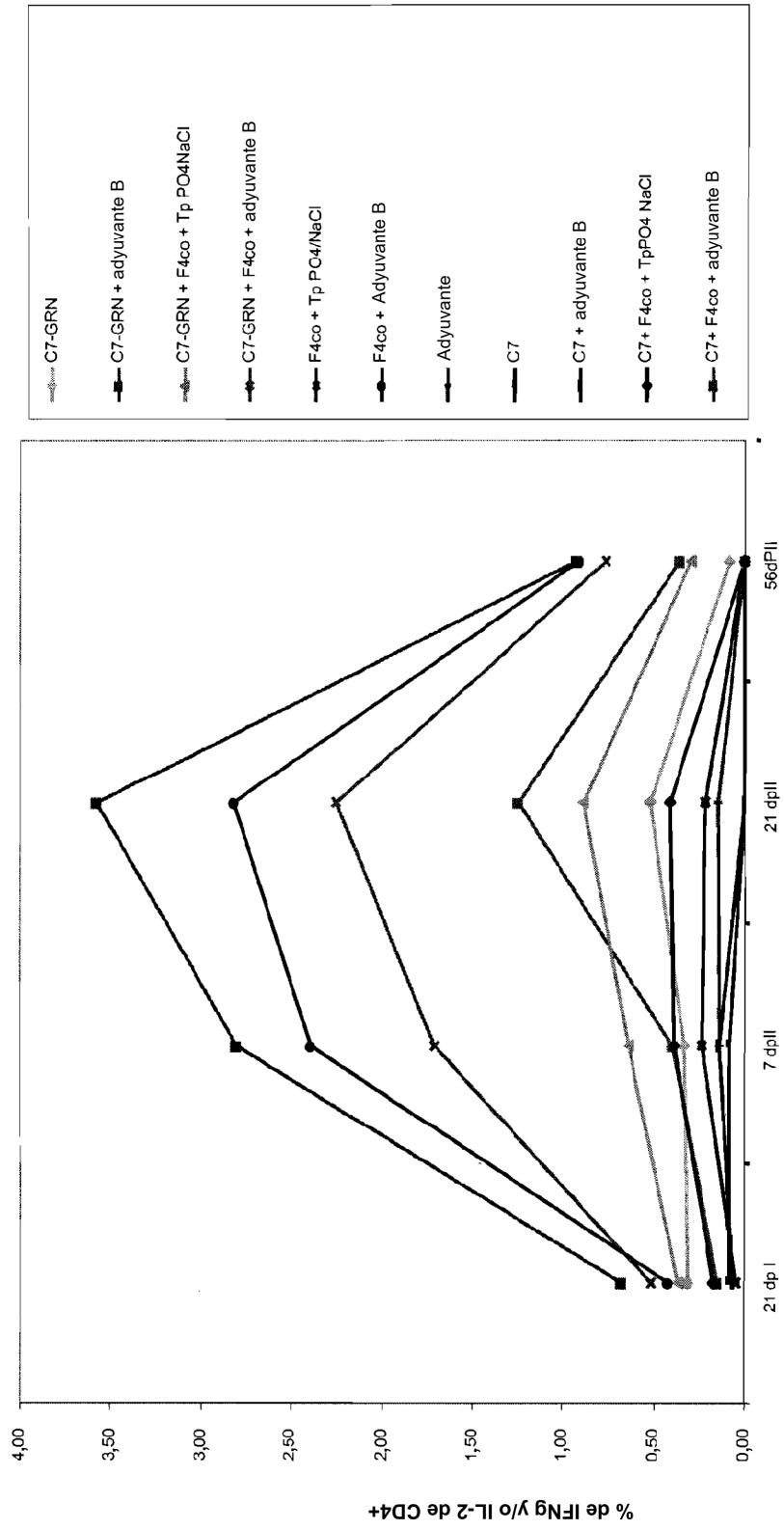


Figura 14

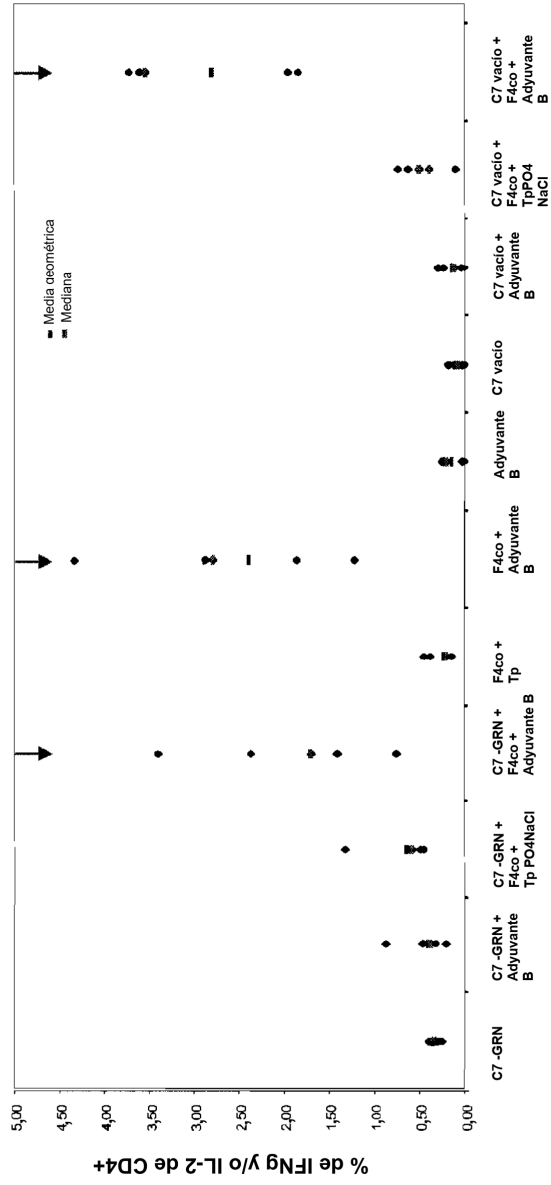


Figura 15A

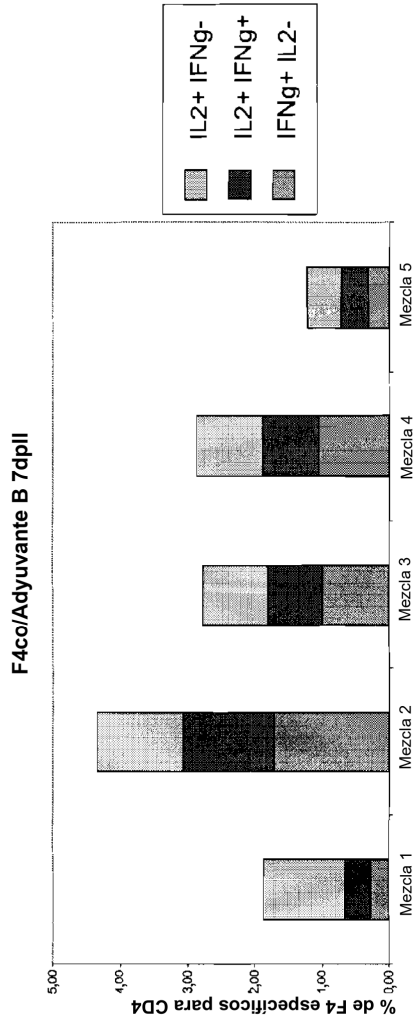


Figura 15B

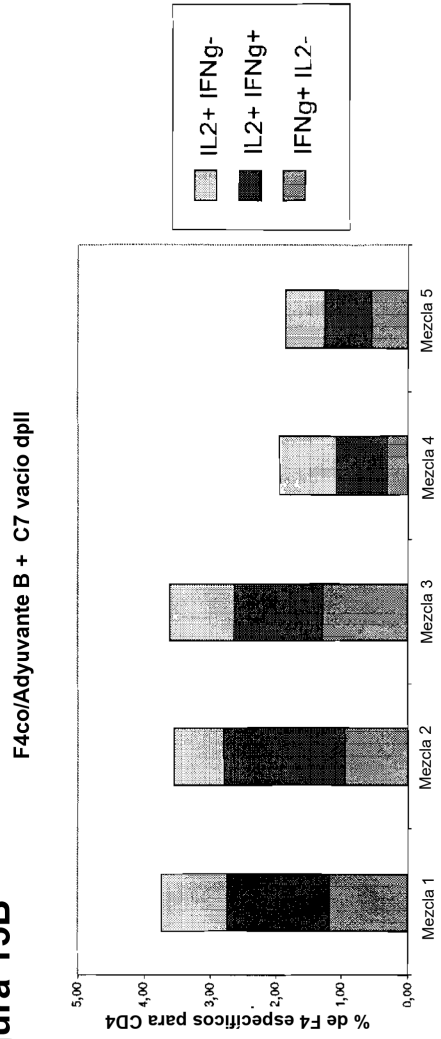


Figura 15C

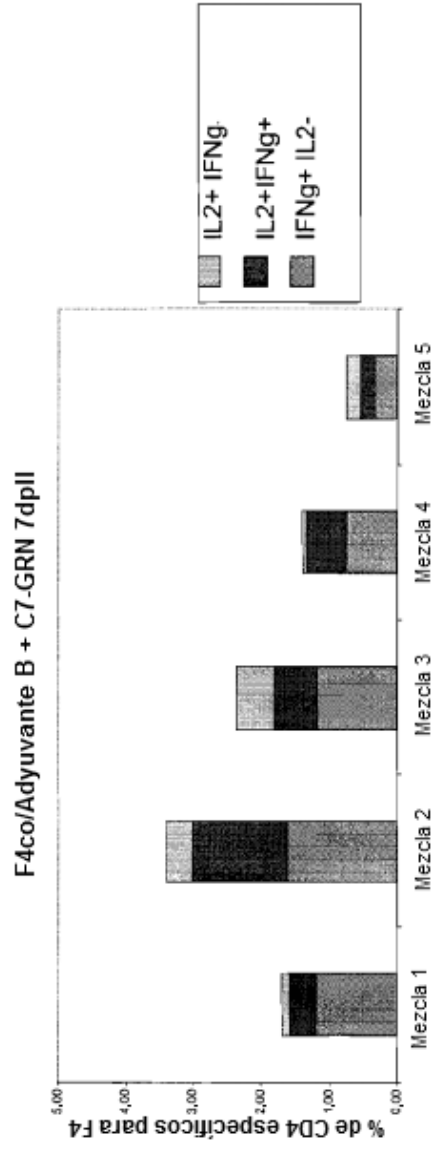


Figura 16

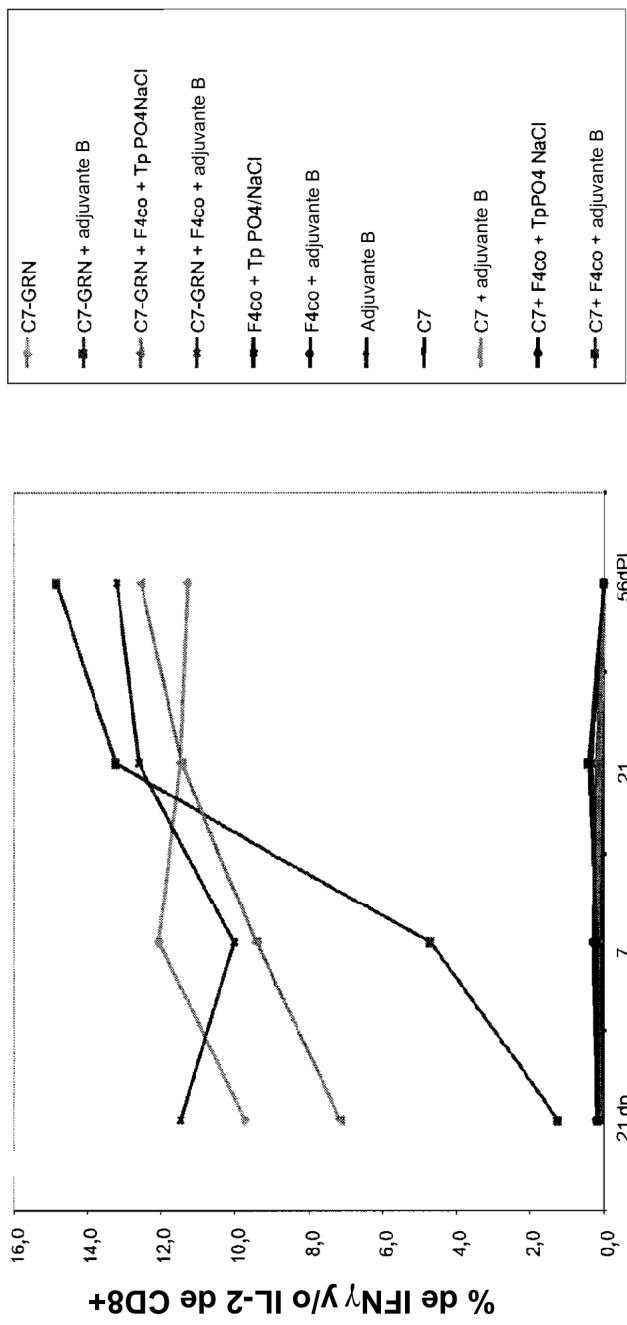


Figura 17A

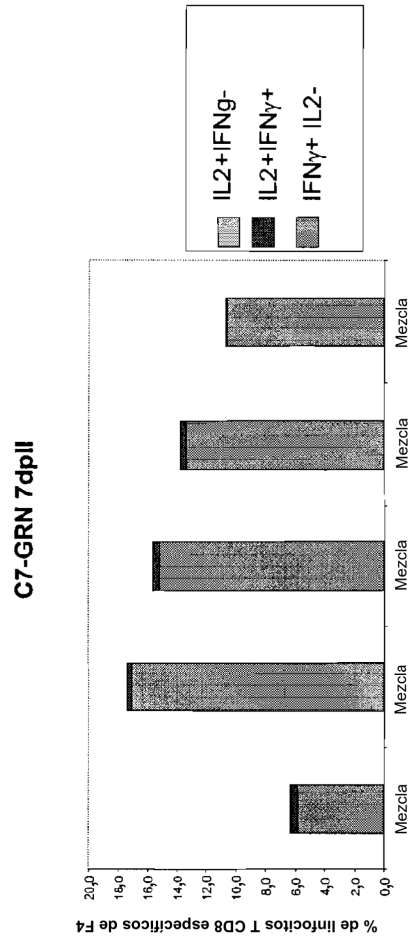


Figura 17B

C7-GRN/adyuvante B 7dpi

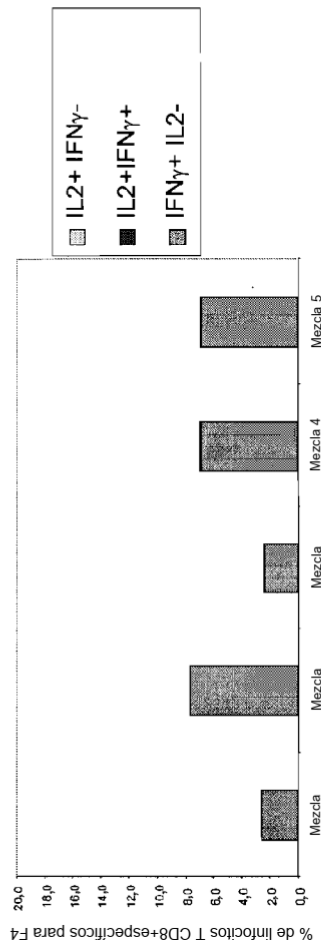


Figura 17 C

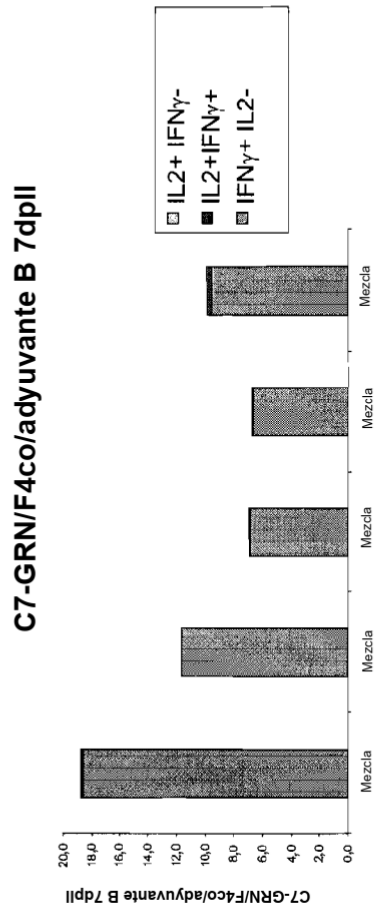


Figura 18

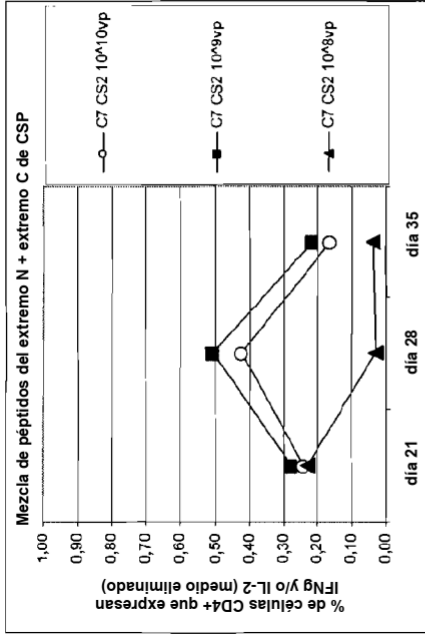


Figura 19

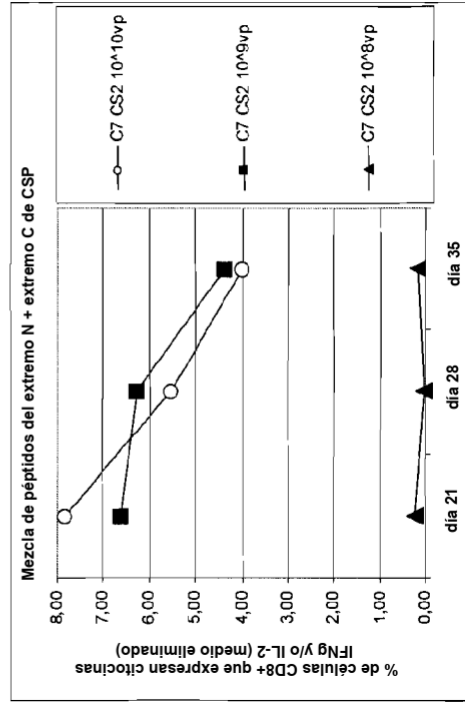


Figura 20

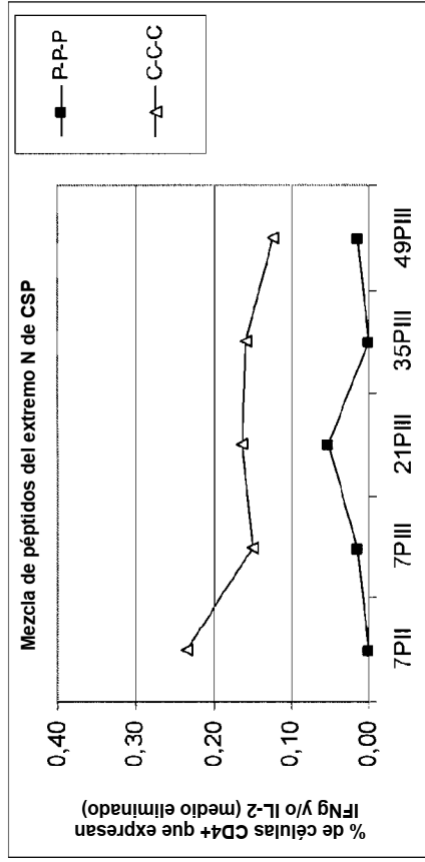


Figura 21

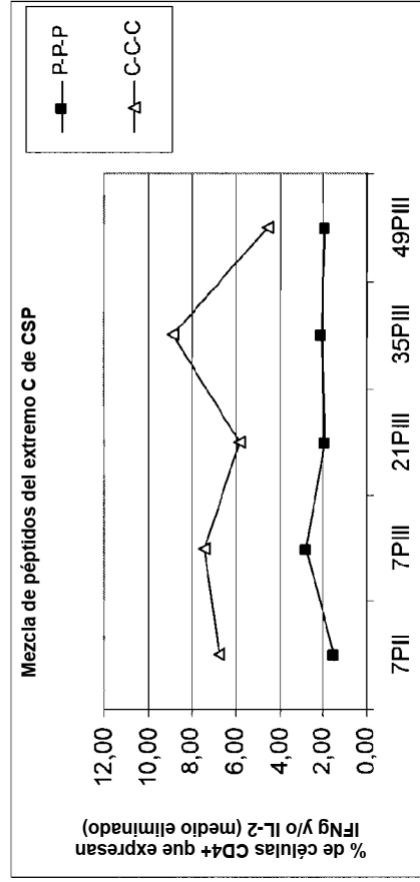


Figura 22

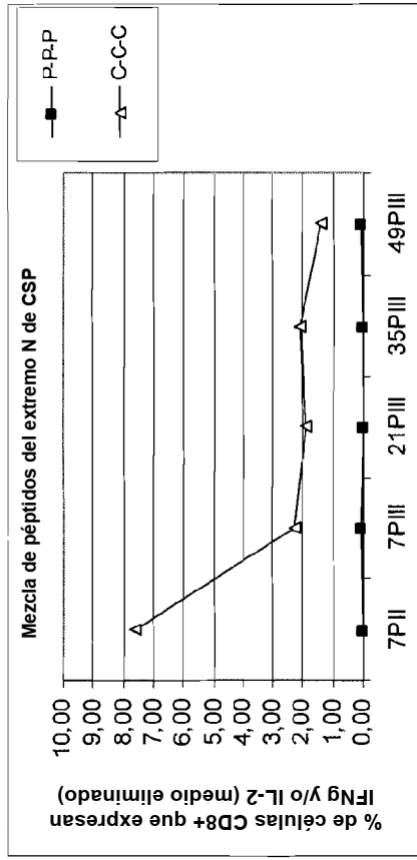


Figura 23

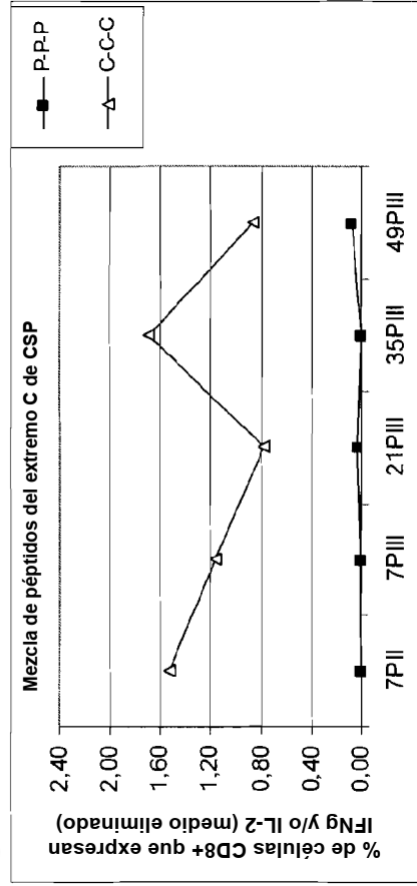


Figura 24

