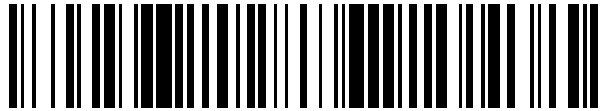


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 418**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2008 PCT/EP2008/052448**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2008 WO08107370**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2008 E 08709258 (1)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2137210**

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:

20.04.2017

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
RUE DE L'INSTITUT 89
1330 RIXENSART, BE**

72 Inventor/es:

VOSS, GERALD HERMANN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 609 418 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. 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 reactogenicidad 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
50 persistencia de la respuesta.

55 El documento WO2004110482 describe vacunación que comprende la co-administración de un antígeno y un vector viral que codifica un antígeno derivado del mismo patógeno elegido como diana por la vacuna como el antígeno co-administrado. Dicho antígeno se deriva de *M. tuberculosis*, Plasmodium, virus de la gripe, VIH, VHC, CMV, VPH o parásitos de Leishmania.

Sumario de la invención

- 5 Se proporciona un procedimiento de fomento de una respuesta inmunitaria frente a un patógeno que comprende 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.
- 10 Se proporciona una composición de vacuna 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.
- También se proporciona 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.
- 15 Dichas vacunas y composiciones inmunógenas estimulan adecuadamente la producción de linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T CD8+ y/o anticuerpos, específicos para patógenos.
- 20 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 inmunoespecífico en vez de un modo no específico dicho patógeno (o parte del mismo).
- También se proporciona 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.
- 25 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.
- 30 También se proporciona 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.
- 35 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.
- 40 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.
- 45 Los procedimientos proporcionados 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 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.
- 50 Por ejemplo, se proporciona 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).

5 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.

10 También se proporciona 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.

15 También se proporciona un kit 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; y en particular que comprende (i) uno o más primeros polipéptidos inmunógenos derivados de un patógeno y un adyuvante; y (ii) uno o más segundos vectores adenovirales que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más polipéptidos inmunógenos derivados de dicho patógeno; para uso en un procedimiento según la invención.

20 Las composiciones y procedimientos proporcionados 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

25 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;

30 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;

35 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;

40 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;

45 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;

50 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;

55 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

Las secuencias anteriormente enumeradas 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 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.

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.

Como se usa en el presente documento, el término "epítipo" se refiere a una secuencia de aminoácidos inmunógenas. Un epítipo 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 epítipo también puede referirse a esa parte de una proteína que es

- 5 inmunógena, en la que el polipéptido que contiene el epítipo se denomina el antígeno (o algunas veces “antígeno de polipéptido”). Un polipéptido o antígeno puede contener uno o más epítipos distintos (por ejemplo 2 o 3 o más). El término “epítipo” engloba epítipos de linfocitos B y linfocitos T. El término “epítipo de linfocitos T” engloba epítipos de linfocitos T CD4+ y epítipos de linfocitos T CD8+ (algunas veces también se denominan en lo sucesivo epítipos CTL).
- 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 epítipos (por ejemplo epítipos 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.
- 10 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.
- 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).
- 15 Los polipéptidos inmunógenos pueden contener uno o más (por ejemplo 1, 2, 3 o 4) antígenos de polipéptidos.
- A menos que se especifique lo contrario, una “respuesta inmunitaria” puede ser una respuesta celular y/o una humoral.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 Adecuadamente, uno o más primeros polipéptidos inmunógenos comprenden al menos un epítipo de linfocitos T.
- Adecuadamente, uno o más segundos polipéptidos inmunógenos comprenden al menos un epítipo de linfocitos T.
- Adecuadamente, el uno o más primeros polipéptidos inmunógenos comprende al menos un epítipo de linfocitos B.
- Adecuadamente, el uno o más segundos polipéptidos inmunógenos comprende al menos un epítipo de linfocitos B.
- 35 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 epítipos 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.
- 40 En otra realización de la invención, 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.
- 45 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
- 50 segundo polipéptido inmunógeno son el mismo.
- 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.

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. Esto es de particular interés cuando el patógeno es VIH. En el caso de VIH, se cree que este control se logra mediante linfocitos T CD8-positivos que reconocen específicamente células infectadas con VIH. Tal respuesta de linfocitos T CD8-positivos se mantiene por la presencia de linfocitos T colaboradores CD4 positivos específicos para VIH. Por tanto, la inducción de ambos tipos de respuesta inmunitaria es particularmente útil y puede lograrse combinando diferentes composiciones de vacunas. Es de particular interés una combinación de una proteína con adyuvante y un adenovirus recombinante. Los pacientes infectados con VIH que se beneficiarán de la vacunación anteriormente descrita están o en la infección primaria, fase de latencia o fase terminal de la infección con VIH en el momento de la vacunación. Los pacientes pueden o pueden no someterse a otras intervenciones de tratamiento terapéutico contra el patógeno (en el caso de VIH - por ejemplo, terapia antirretroviral sumamente activa) en el momento de la vacunación.

Antígenos

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

Proporcionados por referencia, antígenos de polipéptidos adecuados que van a administrarse como polipéptido o polinucleótido que codifican el polipéptido desvelado en el presente documento 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. 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*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo las proteínas raras de la membrana externa), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; 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*.

- 5 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.

15 En particular, los procedimientos o composiciones como se desvelan en el presente documento pueden usarse para proteger contra o tratar trastornos virales tales como aquellos producidos por el virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus del papiloma humano, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o virus del herpes simples; enfermedades bacterianas tales como aquellas producidas por *Mycobacterium tuberculosis* (TB) o *Chlamydia sp*; e infecciones protozoicas tales como malaria.

Debe reconocerse que estos estados de enfermedad específicos, patógenos y antígenos solo se mencionan a modo de ejemplo y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

20 **Antígenos de TB**

Para referencia, el patógeno puede ser, por ejemplo, *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 o-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 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

Para referencia, el patógeno puede ser, por ejemplo, una *Chlamydia sp.*, por ejemplo *C. trachomatis*.

40 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.

45 **Antígenos de Plasmodium**

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 circunsporozoíto (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 circunsporozoíto (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* 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.* Una realización desvelada 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).

Por tanto, en una realización adecuada de la divulgación, el primer y segundo polipéptido inmunógeno se seleccionan de antígenos derivados de *Plasmodium falciparum* y/o *Plasmodium vivax*.

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.

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).

En una realización específica de la divulgación, 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

Para referencia, el patógeno puede ser, por ejemplo, un virus del papiloma humano.

Por tanto, antígenos en la presente divulgación 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 una realización, 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. En una realización, las formas de la proteína de fusión son: L2E7 como se describe en el documento WO96/26277 y proteína D (1/3)-E7 descrita en el documento PCT/EP98/05285.

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, realizaciones particularmente preferidas de éstas incluyen una VLP que comprende proteínas de fusión L1E7 (documento WO96/11272). En una realización, 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

Según la invención, el patógeno es VIH, por ejemplo VIH-1.

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

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.

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.

35 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.

40 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).

45 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 ripo 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 en 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.

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.

Por tanto, los antígenos derivados de VIH-1 para nosotros en la invención 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, particularmente Env, Gag, Nef y Pol y derivados 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.

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 útil según la invención puede excluir la secuencia que codifica el polipéptido p6 de Gag. Un ejemplo particular de una secuencia de Gag para uso en la invención comprende secuencias que codifican p17 y/o p24.

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

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 invención 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 según la invención comprende opcionalmente una mutación para eliminar un sitio que sirve como sitio interno de iniciación en sistemas de expresión procariota.

Opcionalmente, la secuencia de Nef para uso en la invención 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.

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.

Los polipéptidos inmunógenos según la invención 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 invención 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.

Una realización de la invención 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 de la invención, P24 Gag y P66 RT son adecuadamente de codón optimizado.

Construcciones específicas de polinucleótidos y antígenos de polipéptidos correspondientes según la invención 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;
 5. p66 RT (de codón optimizado) - Nef truncado - p17, p24 (de codón optimizado) Gag;
 10 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 otra realización, 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 otras realizaciones, 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.

20 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.

En una realización, 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 según la invención incluyen las siguientes:

- 30 1. p24 - RT - Nef - p17
 2. p24 - RT* - Nef - p17
 3. p24 - p51RT - Nef - p17
 4. p24 - p51RT* - Nef - p17
 5. p17 - p51RT - Nef
 35 6. p17 - p51RT* - Nef
 7. Nef - p17
 8. Nef - p17 con conector
 9. p17 - Nef
 10. p17 - Nef con conector

40 * representa la mutación de metionina₅₉₂ de RT a lisina

En otro aspecto, la presente invención proporciona 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 en este aspecto de la invención son como se describen en el presente documento.

Realizaciones preferidas de este aspecto de la invención 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 invención 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.

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

Los antígenos de VIH de la presente invención 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.

10 En una realización específica 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 una realización específica de la invención, 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).

15 Por tanto, en una realización específica, 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.

En otra realización específica de la invención, un primer polipéptido inmunógeno es Env o un fragmento o derivado del mismo, por ejemplo gp120, gp140 o gp160 (especialmente gp120). En una realización específica de la invención, 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 una realización específica, 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 otra realización específica 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 una realización específica de la invención, un segundo polipéptido inmunógeno es Env o un fragmento o derivado del mismo, por ejemplo gp120, gp140 o gp160 (especialmente gp120).

30 Por tanto, en una realización específica, 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.

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).

45 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 invención siempre que el polipéptido demuestre antigenicidad, es decir, que el polipéptido retenga los epítopos importantes (por ejemplo epítopos CTL).

Adenovirus

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

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 Virol, 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.

5 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.

10 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.

20 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.

25 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.

35 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).

45 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.

50 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.

55 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 desvelados incluyen 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 y no se limitan a 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-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-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 que pueden usarse 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 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 una saponina.

Otros adyuvantes desvelados incluyen ligandos TLR 9 (agonistas). Por tanto, otro inmunoestimulante preferido es un oligonucleótido inmunoestimulante 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 inmunoestimulantes (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 inmunoestimulación 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 inmunoestimulante 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 inmunoestimulantes y pueden usarse en la presente invención.

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 inmunoestimulantes 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.

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).

Otros agonistas de TLR9 de interés potencial incluyen oligonucleótidos que contienen el motivo CpR inmunoestimulante y oligonucleótidos que contienen el motivo YpG (Idera).

Tales inmunoestimulantes 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.

También se prefieren combinaciones de inmunoestimulantes, 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. También desvelada, una combinación de CpG más una saponina tal como QS21 también forma un potente adyuvante para uso en las composiciones y procedimientos desvelados. Alternativamente, la saponina puede formularse en un liposoma o en un ISCOM y combinarse con un oligonucleótido inmunoestimulante.

Por tanto, sistemas de adyuvantes desvelados 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.

5

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

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 desvelada comprende un oligonucleótido CpG solo o junto con una sal de aluminio.

10 En otro aspecto desvelado en el presente documento 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.

Adyuvantes desvelados para uso en las formulaciones según las composiciones y procedimientos desvelados son los siguientes:

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

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.

30 **Composiciones, dosificación y administración**

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

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 Por tanto, en una realización de la invención se proporciona un procedimiento de fomento de una respuesta inmunitaria que 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.

40 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.

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

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

Las composiciones y procedimientos según la invención 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.

50

Las composiciones y procedimientos empleados según la invención 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 patógeno 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 de 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

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.

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 microfluídica M110S. Las gotitas de aceite resultantes tienen un tamaño de aproximadamente 180 nm.

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

5 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.

3) Preparación de MPL liposomal

10 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.

15 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")

20 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.

25 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.

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

Construcción del plásmido de Gag, RT, Nef.

30 **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.

35 **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.

40 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 deleciones 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

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.

45

Ejemplo 1

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

5 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 ug de proteína F4 en 50 ul de adyuvante B. Para la inmunización con Pan7GRN (A) se usaron 10×10^8 partículas de virus en 50 ul 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).

10 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	-	-	-	-

15 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.

Se realizaron las siguientes lecturas:

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

- 20
- 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):

- 25
- 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.

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:

30 Los resultados se muestran en las Figuras 2-8.

Las marcas del eje X se corresponden del siguiente modo:

- 35
- 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

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.

- 5 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.
- 10 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.

- 15 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.
- 20

- 25 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.
- 30

- 35 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.
- 40

Respuestas de anticuerpos:

- 45 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:

- 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;
 - 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
- 55

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.

15 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):

25 - 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:

30 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:

35
 Ady B - Ratones inmunizados con $9 \mu\text{g}$ de F4/ 10^8 vp de Pan7GRN/ adyuvante B sin diluir
 1/2 Ady B - Ratones inmunizados con $9 \mu\text{g}$ de F4/ 10^8 vp de Pan7GRN/ adyuvante B diluido 1/2
 1/4 Ady B - Ratones inmunizados con $9 \mu\text{g}$ de F4/ 10^8 vp de Pan7GRN/ adyuvante B diluido 1/4
 1/10 Ady B - Ratones inmunizados con $9 \mu\text{g}$ de F4/ 10^8 vp de Pan7GRN/ adyuvante B diluido 1/10
 Sin tratamiento previo - Ratones sin tratamiento previo (sin inmunización)

40 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. 45 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:

50 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:

5 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

10 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 conjuntamente se usaron 90 μ g de proteína F4, 10×10^{11} 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}

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

15 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

Respuestas linfoproliferativas:

20 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.

Resultados:

25 Respuesta linfoproliferativa:

30 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 1ª 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 10^{12} partículas virales (vp) de adenovirus y pareció mayor que la de animales inmunizados una vez o dos veces con 10^{10} 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).

Serología:

40 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 2ª 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 2ª 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 10^{10} partículas virales de adenovirus. En conejos inmunizados una vez con 10^{12} 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.

10 Conclusión:

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.

Ejemplo 4

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

20 **Diseño experimental**

Ratones CB6F1 se inmunizaron dos veces (días 0 y 21) con diferentes combinaciones enumeradas más adelante. Se usó F4co/adyuvante B a $9 \mu\text{g}$ de F4co/animal en $50 \mu\text{l}$ de adyuvante B (1/10 de la dosis humana) y el virus C7-GRN a 10^8 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.

25 Combinaciones

C7-GRN
 C7-GRN/ adyuvante B
 C7-GRN/ F4co
 C7-GRN/ F4co/ adyuvante B
 30 F4co
 F4co/ adyuvante B
 adyuvante B
 C7 vacío
 C7 vacío/ adyuvante B
 35 C7 vacío/ F4co
 C7 vacío/ F4co/ adyuvante B

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

Respuestas de linfocitos T CD4 específicos para VIH

Los resultados se muestran en las siguientes figuras:

45 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.

50 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).

5 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.

10 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.

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.

20 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.

Respuestas de linfocitos T CD8 específicos para antígenos

Los resultados se muestran en las siguientes figuras

25 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.

30 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).

35 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.

40 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.

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).

45 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

50 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.

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

5 Diseño experimental:

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).

10 Respuestas de linfocitos T CD4 específicos para CSP

Los resultados se muestran en las siguientes figuras:

15 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.

20 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.

25 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).

Ejemplo de referencia 6

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

Diseño experimental:

35 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

40 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

Los resultados se muestran en las siguientes figuras:

45 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.

50

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 10¹⁰ + 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.

10 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 10¹⁰ + 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 10¹⁰ + adyuvante B] muestran títulos de anticuerpos específicos para CSP similares a los de los ratones inmunizados con 3 inyecciones de RTS,S + adyuvante B.

35 **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.

ES 2 609 418 T3

SECUENCIAS

SEQ ID No 1:

```

1 atgggtgccc gagcttcggt actgtctggt ggagagctgg acagatggga
51 gaaaattagg ctgcgcccg gaggcaaaa gaaatacaag ctcaagcata
101 tcgtgtgggc ctcgagggag cttgaacggt ttgccgtgaa cccaggcctg
151 ctggaaacat ctgagggatg tcgccagatc ctggggcaat tgcagccatc
201 cctccagacc gggagtgaag agctgaggtc cttgtataac acagtggcta
251 ccctctactg cgtacaccag aggatcgaga ttaaggatac caaggaggcc
301 ttggacaaaa ttgaggagga gcaaaacaag agcaagaaga aggcccagca
351 ggcagctgct gacactgggc atagcaacca ggtatcacag aactatccta
401 ttgtccaaaa cattcagggc cagatggttc atcaggccat cagcccccg
451 acgctcaatg cctgggtgaa ggttgctgaa gagaaggcct tttctcctga
501 ggttatcccc atgttctcgg ctttgagtga gggggccact cctcaggacc
551 tcaatacaat gcttaatacc gtgggcccgc atcaggccgc catgcaaatg
601 ttgaaggaga ctatcaacga ggaggcagcc gagtgggaca gagtgcattc
651 cgtcccagct ggcccaatcg cgcccggaca gatgcccggag cctcgccgct
701 ctgacattgc cggcaccacc tctacactgc aagagcaaat cggatggatg
751 accaacaatc ctcccatccc agttggagaa atctataaac ggtggatcat
801 cctgggectg aacaagatcg tgcgcatgta ctctccgaca tccatccttg
851 acattagaca gggacccaaa gagccttta gggattacgt cgaccggttt
901 tataagacc tgcgagcaga gcaggcctct caggaggta aaaactggat
951 gacggagaca ctccctgtac agaacgctaa ccccgactgc aaaacaatct
1001 tgaaggcact aggcccgct gccaccctgg aagagatgat gaccgectgt
1051 cagggagtag gcggaccgg acacaaagcc agagtgttga tgggccccat
1101 cagtcccatac gagaccgtgc cgggtgaagct gaaacccggg atggaccggcc
1151 ccaaggtcaa gcagtggcca ctaccgagg agaagatcaa ggcctgggtg
1201 gagatctgca ccgagatgga gaaagagggc aagatcagca agatcggcc
1251 ggagaacca tacaacacc ccgtgtttgc catcaagaag aaggacagca
1301 ccaagtggcg caagctggtg gatttccggg agctgaataa gcggaccag
1351 gatctctggg aggtccagct gggcatccc catccggccg gcctgaagaa
1401 gaagaagagc gtgaccgtgc tggacgtggg cgaagcttac ttcagcgtcc
1451 ctctggacga ggactttaga aagtacaccg cctttaccat cccatctatc
1501 aacaacgaga ccctggcat cagatatcag tacaacgtcc tccccaggg
1551 ctggaagggc tctcccgcc ttttccagag ctccatgacc aagatcctgg
1601 agccgtttcg gaagcagaac cccgatatcg tcatctacca gtacatggac
1651 gacctgtacg tgggctctga cctggaatc gggcagcatc gcacgaagat
1701 tgaggagctg aggcagcatc tgctgagatg gggcctgacc actccggaca
1751 agaagcatca gaaggagccg ccattcctga agatgggcta cgagctccat
1801 cccgacaagt ggaccgtgca gcctatcgtc ctcccggaga aggacagctg
1851 gaccgtgaac gacatccaga agctggtggg caagctcaac tgggctagcc
1901 agatctatcc cgggatcaag gtgcgccagc tctgcaagct gctgcgcygc
1951 accaaggccc tgaccgaggt gattcccctc acggaggaag ccgagctcga
2001 gctggctgag aaccgggaga tcctgaagga gccctgacac ggcgtgtact
2051 atgaccctc caaggacctg atcgccgaaa tccagaagca gggccagggg
2101 cagtggacat accagattta ccaggagcct ttcaagaacc tcaagaccg
2151 caagtaagcc cgcattgagg ggcgccacac caacgatgct aagcagctga
2201 ccgaggccgt ccagaagatc acgaccgagt ccattcgtgat ctgggggaag
2251 acaccaagt tcaagctgcc tatccagaag gagacctggg agacgtggtg
2301 gaccgaatat tggcaggcca cctggattcc cgagtgggag ttcgtgaata
2351 cactcctct ggtgaagctg tggtagcagc tcgagaagga gccctcgtg
2401 ggcgaggaga cattctacgt ggacggcgcg gccaacccgc aaacaaagct
2451 cgggaaggcc gggtagctca ccaaccgggg ccgccagaag gtcgtcacc
2501 tgaccgacac caccaaccag aagacggagc tgaccggcat ctatctcgt
2551 ctccaggact ccggcctgga ggtgaacatc gtgacggaca gccagtagc
2601 gctgggcatt attcaggccc agccggacca gtccgagagc gaactggtga
2651 accagattat cgagcagctg atcaagaag agaaggtcta cctcgctgg
2701 gtcccggccc ataagggcat tggcggcaac gagcaggtcg acaagctggt
2751 agtgccgggg attagaaggg tgctgatggt gggttttcca gtcacacctc
2801 aggtaccctt aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac
2851 tttttaaag aaaagggggg actggaaggg ctaattcact cccaaagaag

2901 acaagatata cttgatctgt ggatctacca cacacaagge tacttccctg
2951 attggcagaa ctacacacca gggccagggg tcagatatcc actgaccttt
3001 ggatgggtgct acaagctagt accagttgag ccagataagg tagaagaggg
3051 caataaagga gagaacacca gcttgttaca ccctgtgagc ctgcatggga
3101 tggatgacct ggagagagaa gtgttagagt ggaggtttga cagccgccta
3151 gcatttcatac acgtggcccg agagctgcat ccggagtact tcaagaactg
3201 ctga

```

ES 2 609 418 T3

SEQ ID No 2:

```

1  MGARASVLSG  GELDRWEKIR  LRPGGKKKYK  LKHIVWASRE  LERFAVNPGL
51  LETSEGCQRQI  LGQLQPSLQT  GSEELRSLYN  TVATLYCVHQ  RIEIKDTKEA
101  LDKIEEEQNK  SKKKAQQAAA  DTGHSNQVSQ  NYPVQNIQCG  QMVHQAI SPR
151  TLNAWVKVVE  EKAFSPEVIP  MFSALSEGAT  PQDLNMTMLNT  VGGHQAAQM
201  LKETINEEAA  EWDRVHPVHA  GPIAPGQMRE  PRGSDIAGTT  STLQEQIGWM
251  TNNPPIPVGE  IYKRWILLGL  NKIVRMYSP  SILDIRQGPK  EPFRDYVDRF
301  YKTLRAEQAS  QEVKNWMTET  LLVQNANPDC  KTILKALGPA  ATLEEMMTAC
351  QVGGPGHKA  RVLMPISPI  ETVPVKLPK  MDGPKVKQWP  LTEEKIKALV
401  EICTEMEKEG  KISKIGPENP  YNTPVFAIKK  KDSTKWRKLV  DFRELNKRTQ
451  DFWEVQLGIP  HPAGLKKKKS  VTVLDVGDAY  FSVPLDEDFR  KYTAFTIPSI
501  NNETPGIRYQ  YNVLPGWKG  SPAIFQSSMT  KILEPFRKQN  PDIVIQYMD
551  DLYVGSLEI  GQHRTKIEEL  RQHLLRWGLT  TPKKHQKEP  PFLKMGYELH
601  PCKWTVQPIV  LPEKDSWTVN  DIQKLVGKLN  WASQIYPGK  VRQLCKLLRG
651  TKALTEVIPL  TEEAELELAE  NREILKEPVH  GVIYDPSKDL  IAEIQKQGG
701  QWTYQIQEP  FKNLKTGKYA  RMRGAHTNDV  KQLTEAVQKI  TTESIVIWGK
751  TPKFKLPIQK  ETWETWTEY  WQATWIPEWE  FVNTPLVLK  WYQLEKEPIV
801  GAETFYVDGA  ANRETKLGKA  GYVTNRGRQK  VVTLTDTTQ  KTELQAIYLA
851  LQDSGLEVNI  VTDSQYALGI  IQAQPQSES  ELVNQIEQL  IKKEKVYLA
901  VPAHKIGGN  EQVDKLVSAG  IRKVLVGF  VTPQVPLRPM  TYKAAVDLSH
951  FLKEKGGLEG  LIHSQRRQDI  LDLWIYHTQG  YFPDQNYTP  GPGVRYPLTF
1001  GWCYKLVPE  PDKVEANKG  ENTSLLHPVS  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  tcgccctgaa  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  gagccccaga
451  accctgaatg  cctgggtgaa  agtgatcgag  gaaaaggcct  tcagccccga
501  agtgatccct  atgttcagcg  ccctgagcga  gggcgccacc  cccaggacc
551  tgaacgtgat  gctgaaacat  gtgggcggac  accaggccgc  catgcagatg
601  ctgaaggaca  ccatcaatga  ggaggccgcc  gactgggaca  gactgcacc
651  cgtgcaggcc  ggaccatcc  cccctggcca  gatcagagag  cccagaggca
701  gcgacatcgc  cggcaccacc  tccaccctc  aagaacagct  gcagtgatg
751  accggcaacc  ctccatccc  tgtgggcaac  atctacaagc  ggtggatcat
801  cctgggcctg  aacaagattg  tgcggatgta  cagccccgtg  tccatcctgg
851  atatcaagca  gggccccaag  gagccctca  gagactacgt  ggaccggttc
901  ttcaaggccc  tgagagccga  gcaggccacc  caggacgtga  agggctggat
951  gaccgagacc  ctgctgggtg  agaacgcca  ccccactgc  aagagcatcc
1001  tgaaggcctt  gggcagcggc  gccacactgg  aggagatgat  gaccgctgc
1051  cagggagtgg  ggggaccgg  ccacaaggcc  agagtgctgg  cggaggccat
1101  gagccaggcc  cagcagacca  acatcatgat  gcagcggggc  aacttcagag
1151  gccagaagcg  gatcaagtgc  ttcaactgcg  gcaaggaggg  ccactggcc
1201  agaaactgca  gagccccag  gaagaaggcc  tgctggaagt  gtggcaagga
1251  agggcaccag  atgaaggact  gcaccgagag  gcaggccaat  ttctgggca

```

ES 2 609 418 T3

1301 agatttggcc tagcagcaag ggcagacccg gcaatttccc ccagagcaga
 1351 cccgagccca cgcgccctcc cgcgagctg ttcggcatgg gcgagggcat
 1401 cgccagcctg cccaagcagg agcagaagga cagagagcag gtgccccccc
 1451 tgggtgccct gaagtccctg ttcggcaacg atcctctgag ccagggatcc
 1501 cccatcagcc ccatcgagac cgtgccctg accctgaagc ccggcatgga
 1551 tggcccaaaa gtgaaacagt ggcccctgac cgaggagaag attaaggccc
 1601 tgaccgaaat ctgtaccgag atgggaaagg agggcaagat cagcaagatc
 1651 ggccccgaga acccctacaa cacccccatc ttcgccatca agaagaagga
 1701 cagcaccaag tggcggaaac tgggtgactt ccgggagctg aacaagagga
 1751 cccaggactt ctgggaagtg cagctgggca tccccacccc tgcggcctg
 1801 aagaagaaga agtccgtgac agtgctggat gtgggagcag cctacttcag
 1851 cgtgcccctg gacgagaact tcaggaagta caccgccttc accatcccc
 1901 gcaccaacaa cgagaccccc ggagtggat accagtaaaa cgtgctgccc
 1951 cagggtgga agggcagccc cgccatcttc cagagcagca tgaccaagat
 2001 cctggagccc tcccgagca agaaccocga gatcatcatc taccagtaca
 2051 tggccgccc gtatgtggg agcgtctgg agatcggcca gcacaggacc
 2101 aagatcgaag agctgagggc ccacctgctg agctgggctc taccacccc
 2151 cgataagaag caccagaagg agccccctt cctgtggatg ggctacgagc
 2201 tgacccccga taagtggacc gtgcagccca tcatgctgcc cgataaggag
 2251 agctggaccg tgaacgacat ccagaaactg gtgggcaagc tgaattgggg
 2301 cagccaaatc tacgcccgca ttaaagtga gcagctgtgc gacatctga
 2351 gaggcgccaa agccctgaca gacatcgtga cactgacaga ggaggccgag
 2401 ctggagctgg ccgagaacag ggagatcctg aaggaccccg tgcacggcgt
 2451 gtactacgac cccagcaagg acctggtggc cgagattcag aagcagggcc
 2501 aggcaccgat gacctacaa atctaccagg agcctttcaa gaactgaaa
 2551 accgggaagt acgccaggaa gagaagcggc cacaccaacg atgtgaggca
 2601 gctggccgaa gtggtgcaga aagtggctat ggagagcatc gtgatctggg
 2651 gcaagacccc caagtcaag ctgcccctcc agaaggagac ctgggaaacc
 2701 tgggtgatgg actactggca ggccacctgg attcctgagt gggagtctgt
 2751 gaacaccccc cctctggtga agctgtggtg tcagctggag aaggaccccc
 2801 tcctggggcg cgagacctc tacgtggagc gagccgcaa tagagagacc
 2851 aagctgggca aggccggcta cgtgaccgac agaggcagac agaagtgtgt
 2901 gtctctgacc gagacaacca accagaaaac cgagctgac ccatcctgc
 2951 tggccctgca ggacagcggc agcgaagtga acatcgtgac cgactcccag
 3001 tacgccctgg gcatcatca ggcccagccc gatagaagcg agagcgagct
 3051 ggtgaaccag atcatcgaga agctgatcgg caaggacaaa atctacctga
 3101 gctgggtgcc cgcacacaag ggcacggcg gcaacgagca ggtggacaag
 3151 ctggtgtcca cgggcatccg gaaagtgtct tttctggagc gcatcgacaa
 3201 ggcccaggag gaccacgaga gataccacag caactggcgg acaatggcca
 3251 gcgacttcaa cctgcctccc atcgtggcca aggagatcgt ggccagctgc
 3301 gataagtgtc agctgaagg cgaggccatg cacggccagg tggactgcag
 3351 ccctggcatc tggcagctgg cctgcaccca cctggagggc aaagtgatcc
 3401 tgggtggcct gcacgtggcc agcggctaca tcgaggccga agtgattccc
 3451 gccgagaccg gccaggagac gcctactctc ctgctgaaagc tggccggcag
 3501 atggcccctg aaagtgtgtc acaccgcca cggcagcaac ttcacctctg
 3551 ccgcccgtgaa ggcccctgt tgggtgggcca atatccagca gtagtctggc
 3601 atcccctaca accctcagag ccaggggctg gtggccagca tgaacaagga
 3651 gctgaagaag atcatcgccc aggtgagggg ccaggccgag cacctgaaaa
 3701 cagccgtgca gatggcctg ttcattccaca acttcaagcg gaagggcggc
 3751 attggcggtc acagcgcgg agagcggatc atcgacatca tcgccaccga
 3801 tatccagacc aaggaactgc agaagcagat caccaagatt cagaacttca
 3851 gagtgtacta ccgggacagc agggacccca tctggaaggg ccctgccaaag
 3901 ctgctgtgga agggcgaagg cgcctgtgtg atccaggaca acagcgacat
 3951 caaagtgtgt ccccggagga aggccaaagat tctgcgggac tacggcaaac
 4001 agatggccgg cgatgactgc gtggccggca ggcaggatga ggacagatct
 4051 atggccggca agtggtccaa gggcagcatt gtgggctggc ccgagatccc
 4101 ggagagaatg agaagagccc ctgcccggc tcctggagtg ggcgcctgtg
 4151 ctcaggatct ggataagcac ggcgcatca ccagcagcaa catcaacaa
 4201 cccagctgtg tgtggctgga ggcccaggaa gaggaggaag tgggcttccc
 4251 tgtgagacc caggtgcccc tgagacccat gacctacaag ggcgcctctg
 4301 acctgagcca cttcctgaag gagaagggcg gcctggacgg cctgatctac

 4351 agccggaagc ggcaggagat cctggatctg tgggtgtacc acaccaggg
 4401 ctacttcccc gactggcaga attacacccc tggccctgga gtgcggtatc
 4451 ccctgacctt cggctgtgtc tccaagctgg tgccatgga gcccgacgaa
 4501 gtggagaagg ccacagaggg cgagaacaac agcctgtgtc acctatctg
 4551 ccagcacggc atggacgatg aggagcggga agtgctgatc tggaaagtctg
 4601 acagcaggct ggccctgaag cacagagccc aggaactgca cccagagttc
 4651 tacaaggact gctga

ES 2 609 418 T3

SEQ ID No 4:

```

1 MAARASILSG GKLDAWEKIR LRPGGKKKYR LKHLVWASRE LDRFALNPSL
51 LETTEGCQOI MNQLQPAVKI GTTEEIKSLFN TVATLYCVHQ RIDVKDTKEA
101 LDKIEEIQNK SKQKTQQAAA DTGDSSKVSQ NYPPIQNAQG QMIHQNLSPR
151 TLNAWVKVIE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNVMLNI VGGHQAMQM
201 LKDTINEEAA EWDRLHPVQA GPIPPGQIRE PRGSDIAGTT STPQEQQLQWM
251 TGNPPIPVGN IYKRWILGL NKIVRMYSVP SILDIKQGPK EPFRDYVDRF
301 FKALRAEQAT QDVKGWMTET LLVQNANPDC KSILKALGSG ATLEEMMTAC
351 QGVGGPGHKA RVLAEAMSQA QQTNIMMQRG NFRGQKRIKC FNCGKEGHQA
401 RNCRAPRKKG CWKCGKEGHQ MKDCTERQAN FLGKIWPSSK GRPGNFPOSR
451 PEPTAPPAEL FGMGECIASL PKQEQKDREQ VPPLVSLKSL FGNDPLSQGS
501 PISPIETVPV TLKPGMDGPK VKQWPLTEEK IKALTEICTE MEKEGKISKI
551 GPENPYNTPI FAIKKKDSTK WRKLVDFREL NKRTQDFWEV QLGIPHPAGL
601 KKKKSVTVLD VGDAYFSVPL DENFRKYTAF TIPSTNNETP GVRVQYNVLP
651 QGWKGSPIAF QSSMTKILEP FRSKNPEIII YQYMAALYVG SDLEIGQHRT
701 KIEELRAHLL SWGFTTPDKK HQKEPPFLWM GYELHPDKWT VQPIMLPDKE
751 SWTVNDIQKL VGKLNWASQI YAGIKVKQLC RLLRGAKALT DIVTLTEEAE
801 LELAENREIL KDPVHGVYYD FSKDLVAEIQ KQGQDQWYQ IYQEFKLNK
851 TGKYARKRSA HTNDVRQLAE VVQKVAMESI VIWCKTPKFK LPIQKETWET
901 WMDYWOATW IPEWEFVNTF PLVKLWYQLE KDPILGAETF YVDGAANREI
951 KLGKAGYVTD RGRQKVSLT ETTNQKTELH AILLALQDSG SEVNIIVTDSQ
1001 YALGIIQAQP DRSESELVNI IIEKLIKDK IYLSWVPAHK GIGGNEQVDK
1051 LVSSGIRKVL FLDGIDKAQE DHERYHSNWR TMASDFNLPP IVAKEIVASC
1101 DKCQLKGEAM HGQVDCSPGI WQLACTHLEG KVILVAVHVA SGYIEAEVIP
1151 AETGQETAYF LLKLAGRWPV KVVHTANGSN FTSAAVKAAC WWANIQQEFG
1201 IPYNPQSQGV VASMNKELKK IIGQVRDQAE HLKTAVQMAV FIHNFKRKGG
1251 IGGYSAGERI IDIIATDIQT KELQKQITKI QNFRVYYRDS RDPWKGPAK
1301 LLWKGEGAVV IQDNDCIKVV PRRKAKILRD YGKQMGDDC VAGQADRS
1351 MGGKWSKCSI VGWPEIRERM RRAPAAAPGV GAVSQDLKH GAITSSNINN
1401 PSCVWLEAQE EEEVGFVPRP QVPLRPMTYK GAFDLSHPLK EKGGLDGLIY
1451 SRKRQEILD L WVYHTQGYFP DWQNYTPGPG VRYPLTFGWC FKLVPMEPDE
1501 VEKATSGENN SLLHPICQHG MDDEBEREVL I WKFDSRLALK HRAQELHPEF
1551 YKDC

```

SEQ ID No 5:

```

1 atgaggctga tggagatcca gcggaactgc cagcacctgc tgagatgggg
51 catcatgata ctgggcatga ttatcatctg cagcaccgcc gacaacctgt
101 gggtagaccgt gtactacggc gtgcctgtgt ggagagatgc cgagaccacc
151 ctgttctgcy ccagcgacgc caaggcctac agcaccgaga agcacaatgt
201 gtgggcccacc cagcctgcy tgccctaccga tcccaacct caggagatcc
251 ccctggacaa cgtgaccgag gaggttcaaca tgtggaagaa caacatggtg
301 gaccagatgc acgaggacat catcagcctg tgggaccaga gcttgaagcc
351 ctgctgacg ctgaccccc tgtgctgac cctgaactgc agcaagccca
401 gaggtagacgc cacctcaac tccaccgagg acagggagg catgaagaac
451 tgcagctca acatgaccac cgagctgcyg gataagaagc agcaggtgta
501 cagcctgttc taccgctgg acatcgagaa gatcaacagc agcaacaaca
551 acagcgagta cggctggtg aactgcaata ccagcggcat caccaggcc
601 tgcctaaagg tgacctcga gcccattccc atccaactact ggcctctgc
651 cggcttcgcc atcctgaagt gcaacgacac cgagttcaat ggcaccggcc
701 cctgcaagaa tgtgagcacc gtgcagtgca cccacggcat caagccctg
751 gtgtccaccc agctgctgct gaacggcagc ctggccgaga gagaagtgcg

```

ES 2 609 418 T3

801 gatcaggagc gagaacatcg ccaacaaacgc caagaacatc atcgtgcagt
 851 tcgccagccc cgtgaagatc aactgcatcc ggccaacaa caatacccg
 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 tgtggcggcg agttcttcta ctgcaacacc tccggcctgt
 1151 tcaatagcac ctggaccacc aacaacatgc aggagtcaa cgacaccagc
 1201 aacggcacca tcacctgcc ctgcccgatc aagcagatca tccggatgtg
 1251 gcagcgcgtg ggccaggcca tgtacgcccc tcccacgag ggcgtgattc
 1301 gctgcgagag caacatcacc ggccctgatcc tgaccagaga tggcggcaac
 1351 aacaattccg ccaacgagac cttcagacct ggcggcggag atatccggga
 1401 caactggcgg agcagctgtt acaagtaca ggtgggtgag atcgagcccc
 1451 tggcgtggc ccccaccaga gccaaagaaa gagtgggtgga gcgggagaag
 1501 agagccgtgg gcatcggcgc cgtgttctg ggcttcctgg gagccgccgg
 1551 atctacaatg ggagccgcca gcatcacctt gaccgtgca gcccagacgc
 1601 tgctgagcgg catcgtgcag cagcagagca atctgctgag agccatcgag
 1651 gccagcagc agctgctgaa gctgacagtg tggggcatca agcagctgca
 1701 ggccagggtg ctggccgtgg agagatacct gagggaccag cagctcctgg
 1751 gcatctgggg ctgcagcggc aagctgatct gcaccaccaa cgtgccctgg
 1801 aatagcagct ggagcaaaa 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 HACVPTDNPQ QEIPLDNVTE EFNMWKNNMV
 101 DQMHEDIISL WDQSLKPCVQ LTPLCVTLNC SNARVNATFN STEDREGMKN
 151 CSFNMTTELK DKKQQVYSLF YRLDIEKINS SNNNSEYRLV NCNTSAITQA
 201 CPKVTFEPPI IHYCAPAGFA ILKCNDFEFN GTGPCKNVST VQCTHGKIPV
 251 VSTQLLLNGS LAEREVRIRS ENIANNAKNI IVQFASPVKI NCIRPNNNTR
 301 KSYRIGPGQT FYATDIVGDI RQAHCNVSRD DWNNTLRLVA NQLRKYFSNK
 351 TIIFTNSSGG DLEITTHSFN CGGEFFYCNT SGLFNSTWTT NNMQESNDTS
 401 NGTITLPCRI KQIIRMWQRV GQAMYAPPIE GVIRCESNIT GLILTRDGGN
 451 NNSANETFRP GGGDIRDNRW SELYKYKVVK IEPLGVAPTR AKRRVVEREK
 501 RAVGIGAVFL GFLGAAGSTM GAASITLTVQ ARQLLSGIVQ QQSNNLLRAIE
 551 AQQQLLKLTV WGIKQLQARV LAVERYLRDQ QLLGIWGCSG KLICTTNVFPW
 601 NSSWSNKSVD DIWQNMWTLQ WDKEISNYTD IYSLIEESQ NQEKNEQDL
 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
 ttggggccaca catgcctgtg taccacacaga cccaaccca caagaagtag 250
 tattgggaaa tgtgacagaa tattttaaca tgtggaaaaa taacatggta 300
 gaccagatgc atgaggatat aatcagttta tgggatcaaa gcttgaagcc 350
 atgtgtaaaa ttaacccac tctgtgttac tttagattgc gatgatgtga 400
 ataccactaa tagtactact accactagta atggttggac aggagaaata 450
 aggaaaggag aaataaaaaa ctgctctttt aatatacaca caagcataag 500
 agataagggt caaaaagaat atgcactttt ttataacctt gatgtagtac 550
 caatagatga tgataatgct actaccaaaa ataaaactac tagaaacttt 600
 aggttgatac attgtaactc ctcagtcatg acacaggcct gtccaaagggt 650
 atcatttgaa ccaattccca tacattattg tgccccggct ggttttgca 700
 ttctgaagtg taacaataag acgtttgatg gaaaaggact atgtacaaat 750
 gtcagcacag tacaatgtac acatggaatt aggccagtag tgtcaactca 800

ES 2 609 418 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
atTTaatcaa	tcctcaggag	gggacccaga	aattgtaagg	catagtTTta	1150
atttTggagg	ggaatttttc	tactgtgata	caacacaact	gtttaaTagt	1200
actTggaatg	gtactgaag	aaataaacact	gaaggaaata	gcacaatcac	1250
actcccatgt	agaataaaaac	aaattataaa	catgtggcag	gaagtaggaa	1300
aagcaatgta	tgcccctccc	atcggaggac	aaattagatg	ttcatcaaat	1350
attacagggc	tgctattaac	aagagatgg	ggtaccgaag	ggaatgggac	1400
agagaatgag	acagagatct	tcagacctgg	aggaggagat	atgagggaca	1450
atTggagaag	Tgaattatat	aaataaaaag	tagtaaaaag	Tgaaccacta	1500
ggagtagcac	ccaccagggc	aaagagaaga	gtggtgcaga	gataa	1545

SEQ ID No 8:

MKVKETRKNY	OHLWRWG TML	LGMLMICSAA	EQLWVTVYYG	VPVWKEATIT	50
LFCASDAKAY	DTEVHNWVAT	HACVPTD PNP	QEVVLGNVTE	YFNMWKNMV	100
DQMHEDIISL	WDQSLKPCVK	LTPLCVTLDC	DDVNTNSTT	TTSNGWTGEI	150
RKGEIKNCSF	NITTSIRDKV	QKEYALFYNL	DVVPIDDDNA	TTKNKTRNF	200
RLIHCNSSVM	TQACPVSFE	PIPIHYCAPA	GFAILKCNK	TFDGKGLCTN	250
VS TVOCTHGI	RPVVSTQ LLL	NGSLAE EEVV	IRSDNFMDNT	KTIIVQLNES	300
VA INCTRPNN	NTRKGIHIGP	GRAFYAARKI	IGDIRQAHCN	LSRAQWNNTL	350
KQIVIKLREH	FGNKTIKFNO	SSGGDPEIVR	HSFNCGGEFF	YCDTTQLFNS	400
TWNGTEGNNT	EGNSTITLPC	RIKQIINMWQ	EVGKAMYAPP	IGGQIRCSSN	450
ITGLLLTRDG	GTEGNCTENE	TEIFRPGGGD	MRDNWRSELY	KYKVVKVEPL	500
GVAPTRAKRR	VVQR				514

SEQ ID No 9:

atgcatcaca	cgcccgcgtc	cgataacttc	cagctgtccc	agggtgggca	gggatcggcc	60
atcccgatcg	ggcagggcgat	ggcgatcggc	ggccagatcc	gatcgggtgg	ggggtcacc	120
accggtcata	tcgggcctac	cgccttcctc	ggcttgggtg	ttgtcgacaa	caacggcaac	180
ggcgcacgag	tcacaacgct	ggtcgggagc	gctccggcgg	caagtctcgg	catctccacc	240
ggcgacgtga	tcaccgcgg	cgacggcgct	ccgatcaact	cgccaccgc	gatggcggac	300
gcgcttaacg	ggcatcatcc	cgggtgacgtc	atctcgggtga	cctggcaaac	caagtcgggc	360
ggcacgcgta	cagggaaact	gacattggcc	gagggacccc	cgccgaatt	catggtggat	420
ttcggggcgt	taccaccgga	gatcaactcc	gcgaggatgt	acgccggccc	gggtcggcc	480
tcgctggtgg	ccgcggtcca	gatgtgggac	agcgtggcga	gtgacctgtt	ttcggccgcg	540
tcggcggttc	agtcggtggt	ctggggtctg	acgggtgggt	cgtggatagg	ttcgtcggcg	600
ggctctgatgg	tgccggcgcc	ctcgccgat	gtggcggtga	tgagcgtcac	cgcggggcag	660
gcccaggtga	ccgcgcgccca	ggtccgggtt	gctgcggcgg	cctacgagac	ggcgtatggg	720
ctgacggctg	ccccgcgggt	gatcgccgag	aaccgtgctg	aactgatgat	tctgatagcg	780
accaaccctct	tggggcaaaa	caccccggcg	atcgcggtca	acgagggcca	atcggcgag	840
atgtggggccc	aagacgccc	cgcgatgtt	ggctacgccc	cgccgacggc	gacggcgacg	900
gcgacggttc	tgccgttcga	ggaggcgccg	gagatgacca	gcccgggtgg	gctcctcag	960
cagggccgcg	cggtcgagga	ggcctccgac	accgcccagg	cgaaccagt	gatgaacaat	1020
gtgccccagg	cgtgcaaca	gctggcccag	cccaagcagg	gcaccaagcc	ttcttccaag	1080
ctgsgtgggc	tgtggaagac	ggctcgcgg	catcggtcgc	cgatcagcaa	catggtgtcg	1140
atggccaaca	accacatgtc	gatgaccaac	tcgggtgtgt	cgatgaccaa	cacctgagc	1200
tcgatgttga	agggtttg	tcggcgggc	gcccggcagg	cgggtgcaaac	cgcggcgcaa	1260
aacgggggtcc	ggcgatgag	ctcgctgggc	agctcgtgg	gttcttcggg	tctggggcgg	1320
gggggtggcgg	ccaacttggg	tcggggcgcc	tcgggtcggt	cgtgtgctgg	gcccagggcc	1380
tggggccgcg	ccaaccaggc	agtcacccc	gcggcgcggg	cgtgcccgt	gaccagcctg	1440
accagcgccg	cggaaagagg	gcccggcgag	atgctggcg	ggctgcccgt	ggggcagatg	1500
ggcgccaggg	ccgggtggtg	gctcagtggt	gtcgtgctg	ttccgcccgg	accctatgtg	1560
atgcccattc	ctccggcagc	cggcgatata	gccccggcgg	cctgtgctga	ggaccggttc	1620
gccgacttcc	ccgcgtgcc	cctcgaccgc	tcggcgatgg	tcggccaagt	ggggccacag	1680
gtggtcaaca	tcaacaccaa	actgggctac	aacaacgccc	tggcgcccgg	gaccggcctc	1740
gtcatcgatc	ccaacgggtg	cgtgctgacc	aacaaccacg	tgatcgcggg	cgccaccgac	1800
atcaatgctg	tcagcgctcg	ctccggccaa	acctacggcg	tcgatgtggt	cgggatgac	1860
cgcaccaggg	atgtcggggt	gctgcagctc	cgcgggtgcc	gtggcctgcc	gtcggggcgg	1920
atcgggtggc	gcctcgcgg	tggtgagccc	gtcgtcgcga	tgggcaacag	cggtgggcag	1980
ggcggaacgc	cccgtgcggt	gcctggcagg	gtggtcgcgc	tcggccaaac	cgtgcaggcg	2040
tcggattcgc	tgaccgggtg	cgaagagaca	tgaaacgggt	tgatccagt	cgatgcccg	2100
atccagccc	gtgatcggg	cgggcccgtc	gtcaacggcc	taggacaggt	ggtcggtatg	2160
aacagggcgg	cgtcctag					2178

ES 2 609 418 T3

SEQ ID No 10:

MHHTAASDNF	QLSQGGGQFA	IPIGQAMAIA	GQIRSGGGSP	TVHIGPTAFL	GLGVVDNNGN	60
GARVQRVVG	APAASLGIST	GDVITAVDGA	PINSATAMAD	ALNGHHPGDV	ISVTWQTKSG	120
GTRTGNVTLA	EGPPAEFMVD	FGALPPEINS	ARMYAGPGSA	SLVAAAQMW	SVASDLFSAA	180
SAFQSVVWGL	TVGSWIGSSA	GLMVAAASPY	VAWMSVTAQ	AELTAAQVRV	AAAAYETAYG	240
LTVPPPVIIE	NRAELMILIA	TNLLGQNTPA	IAVNEAEYGE	MWAQDAAAMP	GYAAATATAT	300
ATLLPFEEAP	EMTSAGLLE	QAAAVEEASD	TAAANQLMNN	VPQALQQLAQ	PTQGTTPSSK	360
LGGLWKTVP	HRSPISNMVS	MANNHMSMTN	SGVSMNTLS	SMLKGFAPAA	AAQAVQTAAQ	420
NGVRAMSSLG	SSLGSSGLGG	GVAANLGRAA	SVGSLVSPQA	WAAANQAVTP	AARALPLTSL	480
TSAAERGPQ	MLGGLPVGQM	GARAGGGLSG	VLRVPPRPYV	MPHSPAAGDI	APPALSQDRF	540
ADFPALPLDP	SAMVAQVGPQ	VVNINTKLCY	NNAVGAGTGI	VIDPNGVVL	NNHVIAGATD	600
INAFSVGSGQ	TYGVDVGYD	RTQDVAVLQL	RGAGGLPSAA	IGGGVAVGEP	VVAMGNSGGQ	660
GCTPRAVPR	VVALGQTVQA	SDSLTGAEET	LNGLIQFDAA	IQPGDAGGPV	VNGLGQVVGM	720
NTAAS						725

SEQ ID No 11:

atgatgagaa	aacttgccat	cctcagegctc	agctctttcc	tgttcgtgga	50
ggccctcttc	caggagtac	agtgctacgg	aagcagcagc	aatacaaggg	100
tcctgaacga	gctcaactat	gacaacgctg	gaaacgaacct	gtataacgag	150
ctggagatga	actactatgg	caagcaggag	aactggtata	gcctgaagaa	200
gaacagccgg	tccctgggcg	agaacgacga	cggcaacaac	aacaacggcg	250
acaacggcag	ggagggcaaa	gatgaggaca	agagggacgg	gaacaacgag	300
gataaacgaga	agctgcggaa	gccaagcac	aagaaactca	agcagcccgc	350
cgacgggaac	ccggacccca	atgcaaatcc	caacgctcgc	ccaaaacgcaa	400
accctaactg	ggaccccaac	gccaatccca	acgtcgatcc	taatgccaat	450
ccaaatgcca	accetaacgc	aaatccta	gcaaaaccca	acgccaatcc	500
taacgccaac	ccaaatgcca	acccaacgc	taacccaac	gtaacccaac	550
atgcaaatcc	caatgcta	ccaaacgtg	accctaacgc	taacccaac	600
gcaaacccca	acgccaatcc	taacgcaaac	cccaatgcaa	acccaacgc	650
aaatcccaac	gtaacccta	acgcaaaccc	caacgccaac	cctaatagcca	700
acccaatgc	taacccaac	gccaatccaa	acgcaaatcc	aaacgccaac	750
ccaaatgcaa	acccaacgc	taatcccaac	gccaaccca	acgccaatcc	800
taacaagaac	aatcagggca	acgggcaggg	ccataacatg	ccgaacgacc	850
ctaatacgga	tgtggacgag	aacgccaacg	ccaacagcgc	cgtgaagaac	900
aacaacaacg	aggagccctc	cgacaagcac	atcaaggaat	acctgaacaa	950
gatccagaac	agtctgagca	ccgagtggct	cccctgctcc	gtgacctgcg	1000
gcaacggcat	ccaggtgagg	atcaagcccg	gctccgcca	caagcccaag	1050
gacgagctgg	actacgcca	cgacatcgag	aagaagatct	gcaagatgga	1100
gaaatgcagct	ctgtgttcaac	gtcgtgaa	ctcgcctc	ggcctgtga	1149

5

SEQ ID No 12:

MMRKLAILSV	SSFLFVEALF	QEYQCYGSSS	NTRVLNELNY	DNAGTNLYNE	50
LEMNYYGKQE	NWYSLKNSR	SLGENDDGNN	NNGDNGREGK	DEDKRDGNNE	100
DNEKLRKPKH	KKLKQPADGN	PDPNANPNVD	PNANPNVDPN	ANPNVDPNAN	150
PNANPNANPN	ANPNANPNAN	PNANPNANPN	ANPNANPNAN	PNVDPNANPN	200
ANPNANPNAN	PNANPNANPN	ANPNANPNAN	PNANPNANPN	ANPNANPNAN	250
PNANPNANPN	ANPNANPNKN	NQNCQGHNM	PNDPNRNVD	NANANSVKN	300
NNNEEPSDKH	IKEYLNKIQN	SLSTEWSPCS	VTCNGIQVR	IKPGSANKPK	350
DELDYANDIE	KKICKMEKCS	SFNVVNSAI	GL		382

ES 2 609 418 T3

SEQ ID No 13:

atgatggctc	cggatcctaa	tgcaaatcca	aatgcaaacc	caaacgcaaa	50
ccccaatgca	aatcctaatag	caaaccocaa	tgcaaatcct	aatgcaaatc	100
ctaattgccaa	tccaaatgca	aatccaaatg	caaaccocaa	cgcaaacccc	150
aatgcaaatc	ctaattgccaa	tccaaatgca	aatccaaatg	caaaccocaa	200
tgcaaaccca	aatgcaaacc	ccaatgcaaa	tcctaataaa	aacaatcaag	250
gtaatggaca	aggtcacaat	atgccaaatg	accocaaaccg	aatgttagat	300
gaaaaatgcta	atgccaaacag	tgctgtaaaa	aataataata	acgaagaacc	350
aagtgataag	cacataaaaag	aataatttaa	caaaatacaa	aattctcttt	400
caactgaatg	gtccccatgt	agtgtaaact	gtggaaatgg	tattcaagtt	450
agaataaaagc	ctggctctgc	taataaacct	aaagacgaat	tagattatgc	500
aaatgatatt	gaaaaaaaaa	tttgtaaaat	ggaaaaatgt	tccagtgtgt	550
taaatgtcgt	aaatagttca	ataggattag	ggcctgtgac	gaacatggag	600
aacatcacat	caggattcct	aggacccctg	ctcgtgttac	aggcggggtt	650
tttcttggtg	acaagaatcc	tcacaatacc	gcagagtcta	gactcgtggt	700
ggactctctc	caattttcta	gggggatcac	ccgtgtgtct	tggccaaaat	750
tcgcaatccc	caacctccaa	tcactcacca	acctcctgtc	ctccaatttg	800
tcctggttat	cgctggatgt	gtctgcccgc	ttttatcata	ttcctcttca	850
tcctgctgct	atgcctcacc	ttcttattgg	ttctcttggg	ttatcaaggt	900
atgttgcccg	ttgtcctct	aattccagga	tcaacaacaa	ccaatcggg	950
acctgcaaaa	acctgcacga	ctcctgctca	aggcaactct	atgtttccct	1000
ca tgttgctg	tacaaaaact	acggatggaa	attgcacctg	tattcccatc	1050
ccatcgtcct	gggctttcgc	aaaataccta	tgggagtggg	cctcagtcgg	1100
tttctcttgg	ctcagtttac	tagtccatt	tgttcagtgg	ttcgtagggc	1150
tttccccccac	tgtttggett	tcagctatat	ggatgatgtg	gtattggggg	1200
ccaagtctgt	acagcatcgt	gagtccttt	ataccgctgt	taccaatttt	1250
cttttgcttc	tgggtataca	tttaa			1275

SEQ ID No 14:

MMAPDPNANP	NANPNANPNA	NPANPNANP	NANPNANPNA	NPANPNANP	50
NANPNANPNA	NPANPNANP	NANPNANPNK	NNQNGQGHN	MPNDPNRNV	100
ENANANSAVK	NMNNEPSDK	HIKEYLNRIQ	NSLSTEWSPC	SVTCNGIIV	150
RIKPGSANKP	KDELDIYANDI	EKKICKMEKC	SSVFNVNSS	IGLGPVTNME	200
NITSGFLGPL	LVLQAGFLL	TRILTIPQSL	DSWWTSLNFL	GGSPVCLGQN	250
SQSPTSNSHP	TSCPPICPGY	RWMCLRRFII	FLFILLLCLI	FLLVLLDYQG	300
MLPVCPILIPG	STTTNTGPCK	TCTTPAQNS	MFPSCCCTKP	TDGNCTCIPI	350
PSSWAFAYKL	WEWASVRFWS	LSSLVFPVQW	FVGLSPTVWL	SAIWMWYWG	400
PSLYSIVSPF	IPLLPIFFCL	WVYI			424

5

SEQ ID No 15:

atggtcattg	ttcagaacat	acagggccaa	atggtcacc	aggcaattag	50
tcggcgaact	cttaatgcat	gggtgaaggt	cgtagggaa	aaggcattct	100
ccccggaggt	cattccgatg	ttttctgcgc	tatctgaggg	cgcaacgcgg	150
caagacctta	ataccatgct	taacacggta	ggcgggcacc	aagccgctat	200
gcaaatgcta	aaagagacta	taaacgaaga	ggccgccgaa	tgggatcgag	250
tgcaaccggg	gcacgccggc	ccaattgcac	caggccagat	gcgcgagccg	300
cgcgggctcg	atattgcagg	aactacgtct	accttcagg	agcagattgg	350
gtggatgact	aacaatccac	caatcccgg	eggagagatc	tataagaggt	400
ggatcatact	gggactaaac	aagatagtcc	gcattgattc	tccgacttet	450
atactggata	tacgccaaag	cccaaaggag	ccgttcaggg	actatgtcga	500
ccgattctat	aagacctctc	gcgcagagca	ggcatcccag	gaggtcaaaa	550
attggatgac	agaaactctt	ttggtgcaga	atgcgaatcc	ggattgtaaa	600
acaatttttaa	aggetctagg	accggccgca	acgctagaag	agatgatgac	650
ggcttctcag	ggagtccgtg	gaccggggca	taaagcccgc	gtcttacaca	700
tgggcccgat	atctccgata	gaacagttt	cggtcaagct	taaaccaggg	750
atggatggtc	caaaggtcaa	gcagtgccg	ctaacgggaag	agaagattaa	800
ggcgctccta	gagatttgta	ctgaaatgga	gaaggaaggc	aagataagca	850
agatcggggc	agagaacccg	tacaatacac	cggtatttgc	aataaagaaa	900

ES 2 609 418 T3

aaggattcaa caaaatggcg aaagcttgta gattttaggg aactaaacaa 950
gcgaacccaa gacttttggg aagtccaact agggatccca catccagccg 1000
gtctaagaa gaagaaatcg gtcacagtc tggatgtagg agacgcata 1050
tttagtgtag cgcttgatga ggacttccga aagtatactg cgtttactat 1100
accgagcata aacaatgaaa cggcaggcat tcgctatcag tacaacgtgc 1150
tccccgaggg ctggaagggg tctccggcga tatttcagag ctgtatgaca 1200
aaaatacttg aaccattccg aaagcagaat ccggatattg taatttacca 1250
atcacatggac gatctctatg tgggctcggg tctagaaat gggcagcatc 1300
gcactaagat tgaggaaactg aggcacaatc tgcttcgatg gggcctcact 1350
actcccgaca agaagcacca gaaggagccg ccgttcctaa agatgggcta 1400
cgagcttcat ccggacaagt ggacagta ca gccgatagtg ctgcccga 1450
aggattcttg gaccgtaaat gatattcaga aactagtcgg caagcttaac 1500
tgggctcttc agatttacc caggcattaag gtccgacagc tttgcaagct 1550
actgagggga actaaggctc taacagaggt catcccatta acggaggaag 1600
cagagcttga gctggcagag aatcgcgaaa ttcttaagga gccggtgcac 1650
gggggtatact acgaccctc caaggacctt atagccgaga tccagaagca 1700
ggggcagggc caatggacgt accagatata tcaagaaccg tttagaatc 1750
tgaagactgg gaagtacgg cgcatgaggg gggctcctac taatgatgta 1800
aagcaactta cggaaagcagt acaaaagatt actactgagt ctatgtgat 1850
atggggcaag accccaaagt tcaagctgcc catacagaag gaaacatggg 1900
aaacatgggt gactgaatat tggcaagcta cctggattcc agaattggga 1950
tttgtcaaca cgccgccact tgttaagctt tggaccagc ttgaaaagga 2000
gccgatagta ggggcagaga ccttctatgt cgtggcgcgc gcgaatcgcg 2050
aaacgaagct aggcaaggcg ggatacgtga ctaatagggg ccgccaaaag 2100
gtcgttaacc ttacggatc caccaatcag aagactgaac tacaagcgat 2150
ttacctgca cttcaggata gtggcctaga ggtcaacata gtcacggact 2200
ctcaatatgc gcttggcatt atcaagcgc agccagatca aagcgaagc 2250
gagcttghaa accaaaataat agaacagctt ataaagaaag agaaggtata 2300
tctggcctgg gtcccgcctc acaagggaat tggcggcaat gagcaagtg 2350
acaagctagt cagcgtggg attcgcagg ttcttgcgat ggggggtaag 2400
tggcttaagt ctagcgtagt cggctggccg acagtcgcgc agcgcagtg 2450
acgcccga cccagccgag atggcgtggg ggcagcgtct agggatctgg 2500
agaagcaccg ggctataact tccagtaaca cggcggcga gaacgcccga 2550
tgcgcatggt tagaagccca agaagaggaa gaagttaggt tcccgtaac 2600
tcccaggtg ccgttaaggc cgatgacct taaggcagc gtggatcttt 2650
ctcacttcc taaaggagaaa ggggggctgg agggcttaat tcacagccag 2700
agcgcagcag atattcttga tctgtggatt taccataacc aggggtactt 2750
tccggactgg cagaattaca ccccggggcc aggcgtgcgc tatcccctga 2800
cttctgggtg gtgctacaaa ctagtcccag tggaaaccga caaggtcgaa 2850
gaggcttaata agggcgagaa cacttctctt ctcaaccgg taagcctgca 2900
cgggatggat gaccagaac gagaggttct agaattggag ttcgactctc 2950
gacttgcgtt ccatcagta gcacgcgagc tgcatccaga atatttcaag 3000
aactgccgcc caatgggccc cagggccagt gtacttagtg gccgagaact 3050
agatcgatgg gaaaagatac gcctacgcc ggggggcaag aagaagtaca 3100
agcttaagca catttgttgg gcctctcgcg aacttgagc attcgcagtg 3150
aatccaggcc tgcttgagac gagtgaaggc tgtaggcaaa tcttggggca 3200
gctacagccc agcctacaga ctggcagcga ggagcttcgt agtcttata 3250
atacgcgtcg gactctctac tgcgttcac aacgaattga aataaaggat 3300
actaaagagg cccttgataa aattgaggag gaacagaata agtcgaaaaa 3350
gaaggcccag caggcccgcg ccgacaccgg gcacagcaac caggtgtccc 3400
aaaactacta a 3411

SEQ ID No 16:

MVIVQNIQGG MVHQAI SPRT LNAWVKVVEE KAFSPEVIPM FSALSEGATP 50
QDLNMLNTV GGHQAAMQML KETINEEAAE WDRVHPVHAG PIAPGQMPREP 100
RGS DIAGTTS TLQEQIGWMT NNPPIPVGEI YKRWIILGLN KIVRMYSPTS 150
ILDIRQGPKE PFRDYVDRFY KTLRAEQASQ EVKNWMTETL LVQANPDCK 200
TILKALGPAA TLEEMMTACQ GVGPGHKAR VLHMGPI SPI ETVSVKLPK 250
MDGPKVKQWP LTEEKIKALV EICTEMEKEG KISKIGPENP YNTPVFAIKK 300
KDS TKWRKLV DFRELNKRTO DFWEVQLGIP HPAGLKKKKS VTVLVDVGDAY 350

FVPLDEDFR	KYTAFTIPSI	NNETPGIRYQ	YNVLPQGWK	SPAIFQSCMT	400
KILEFFRKQN	PDIVIQYMD	DLYVGSLEI	GQHRTKIEEL	RQHLLRWGLT	450
TPDKKHQKEP	PFLKMGYELH	PDKWTVQPIV	LPEKDSWTVN	DIQKLVGKLN	500
WASQIYPGIK	VRQLCKLLRG	TKALTEVIPL	TEEAELAE	NREILKEPVH	550
GVYYDPSKDL	IAEIQKQGG	QWTYQIQEP	FKNLKTGKYA	RMRGAHTNDV	600
KQLTEAVQKI	TTESIVIWGK	TPKFKLPIQK	ETWETWTEY	WQATWIPEWE	650
FVNTPLVKL	WYQLEKEPIV	GAETFYVDGA	ANRETKLGKA	GYVTNRGRQK	700
VVTLTDTTNO	KTELQAIYLA	LQDSGLEVNI	VTDSQYALGI	IOAOPDQSES	750
ELVNQIIEQL	IKKEKVYLAW	VPAHKGIGGN	EQVDKLVSA	IRKVLAMGGK	800
WSKSSVVGWP	TVRERMRAE	PAADGVGAAS	RDLEKHGAIT	SSNTAATNAA	850
CAWLEAQEEB	EVGFPVTPQV	PLRPMTYKAA	VDLSHFLKEK	GGLEGLIHSQ	900
RRQDILDWI	YHTQGYFPDW	QNYTPGPGVR	YPLTFGWCYK	LVPVEPKVE	950
EANKGENTSL	LHPVSLHGMD	DPEREVLEWR	FDSRLAFHHV	ARELHPEYFK	1000
NCRPMGARAS	VLSGGELDRW	EKIRLRPGGK	KKYKLKHIVW	ASRELERFAV	1050
NPGLLETSEG	CRQILGQLQP	SLQTGSEELR	SLYNTVATLY	CVHQRIEIKD	1100
TKEALDKIEE	EONKSKKKAQ	QAAADTGHSN	QVSONY		1136

En toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que la palabra 'comprender' y variaciones tales como 'comprende' y 'que comprende' implican la inclusión de un número entero, etapa, grupo de números enteros o grupo de etapas establecido, pero no la exclusión de cualquier otro número entero, etapa, grupo de números enteros o grupo de etapas.

La solicitud de la que forma parte esta descripción y reivindicaciones puede usarse como base de prioridad con respecto a cualquier solicitud posterior. Las reivindicaciones de tal solicitud posterior pueden referirse a cualquier rasgo o combinación de rasgos descritos en el presente documento. Pueden tomar la forma de reivindicaciones de producto, composición, procedimiento o de uso.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Glaxosmithkline Biologicals Glaxosmithkline Biologicals
- <120> Procedimiento novedoso y composiciones
- <130> V62209
- <160> 16
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 3204
- <212> ADN
- <213> VIH
- <400> 1

ES 2 609 418 T3

atgggtgccc gagcttcggt actgtctggt ggagagctgg acagatggga gaaaattagg	60
ctgcgcccgg gaggcaaaaa gaaatacaag ctcaagcata tcgtgtgggc ctcgagggag	120
cttgaacggg ttgccgtgaa cccaggcctg ctggaacat ctgagggatg tcgccagatc	180
ctggggcaat tgcagccatc cctccagacc gggagtgaag agctgaggtc cttgtataac	240
acagtggcta ccctctactg cgtacaccag aggatcgaga ttaaggatac caaggaggcc	300
ttggacaaaa ttgaggagga gcaaaacaag agcaagaaga aggccagca ggcagctgct	360
gacactgggc atagcaacca ggtatcacag aactatccta ttgtccaaaa cattcagggc	420
cagatggttc atcaggccat cagcccccg acgctcaatg cctgggtgaa ggttgtcgaa	480
gagaaggcct tttctcctga ggttatcccc atgttctccg ctttgagtga gggggccact	540
cctcaggacc tcaatacaat gcttaatacc gtgggcggcc atcaggccgc catgcaaatg	600
ttgaaggaga ctatcaacga ggaggcagcc gagtgggaca gagtgcattc cgtccacgct	660
ggcccaatcg cgcccgaca gatgcgggag cctcgcggct ctgacattgc cggcaccacc	720
tctacactgc aagagcaaat cggatggatg accaacaatc ctcccatccc agttggagaa	780
atctataaac ggtggatcat cctgggcctg aacaagatcg tgcgcatgta ctctccgaca	840
tccatccttg acattagaca gggacccaaa gagccttita gggattacgt cgaccggttt	900
tataagaccc tgcgagcaga gcaggcctct caggaggcca aaaactggat gacggagaca	960
ctcctggtac agaacgctaa ccccgactgc aaaacaatct tgaaggcact aggcccggct	1020
gccaccctgg aagagatgat gaccgctgt cagggagtag gcggacccgg acacaaagcc	1080
agagtgttga tggcccccac cagtccatc gagaccgtgc cggatgaagct gaaaccggg	1140
atggacggcc ccaaggctca gcagtggcca ctcaccgagg agaagatcaa ggccctggtg	1200
gagatctgca ccgagatgga gaaagagggc aagatcagca agatcgggcc ggagaacca	1260
tacaacaccc ccgtgtttgc catcaagaag aaggacagca ccaagtggcg caagctggtg	1320
gatttccggg agctgaataa gcggaccag gatttctggg aggtccagct gggcatcccc	1380
catccggccg gcctgaagaa gaagaagagc gtgaccgtgc tggacgtggg cgacgcttac	1440
ttcagcgtcc ctctggacga ggaactttaga aagtacaccg cctttaccat cccatctatc	1500

ES 2 609 418 T3

```

aacaacgaga cccctggcat cagatatcag tacaacgtcc tccccaggg ctggaagggc 1560
tctcccgcca ttttccagag ctccatgacc aagatcctgg agccgtttcg gaagcagaac 1620
cccgatatcg tcatttacca gtacatggac gacctgtacg tgggctctga cctggaaatc 1680
gggcagcatc gcacgaagat tgaggagctg aggcagcatc tgctgagatg gggcctgacc 1740
actccggaca agaagcatca gaaggagccg ccattcctga agatgggcta cgagctccat 1800
cccgacaagt ggaccgtgca gcctatcgtc ctccccgaga aggacagctg gaccgtgaac 1860
gacatccaga agctggtggg caagctcaac tgggctagcc agatctatcc cgggatcaag 1920
gtgcgccagc tctgcaagct gctgcgcggc accaaggccc tgaccgaggt gattccccctc 1980
acggaggaag ccgagctcga gctggctgag aaccgggaga tctgaagga gcccgtgcac 2040
ggcgtgtact atgaccctc caaggacctg atcgccgaaa tccagaagca gggccagggg 2100
cagtggacat accagattta ccaggagcct ttcaagaacc tcaagaccgg caagtacgcc 2160
cgcatgaggg gcgcccacac caacgatgtc aagcagctga ccgaggccgt ccagaagatc 2220
acgaccgagt ccatcgtgat ctgggggaag acaccaagt tcaagctgcc tatccagaag 2280
gagacctggg agacgtggtg gaccgaatat tggcaggcca cctggattcc cgagtgggag 2340
ttcgtgaata caccctctt ggtgaagctg tggtagcagc tcgagaagga gcccatcgtg 2400
ggcgcggaga cattctacgt ggacggcgcg gccaaaccgg aaacaaagct cgggaaggcc 2460
gggtacgtca ccaaccgggg ccgccagaag gtcgtcacc tgaccgacac caccaaccag 2520
aagacggagc tgcaggccat ctatctcgtc ctccaggact ccggcctgga ggtgaacatc 2580
gtgacggaca gccagtacgc gctgggcatt attcaggccc agccggacca gtccgagagc 2640
gaactggtga accagattat cgagcagctg atcaagaaag agaaggtcta cctcgcctgg 2700
gtcccggccc ataagggcat tggcggcaac gagcaggtcg acaagctggt gagtgcgggg 2760
attagaaagg tgctgatggt gggttttcca gtcacacctc aggtacctt aagaccaatg 2820
acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaag aaaagggggg actggaaggg 2880
ctaattcact cccaagaag acaagatata ctgatctgt ggatctacca cacacaaggc 2940
tacttccctg attggcagaa ctacacacca gggccagggg tcagatatcc actgacctt 3000
ggatggtgct acaagctagt accagttgag ccagataagg tagaagaggc caataaagga 3060
gagaacacca gcttgttaca ccctgtgagc ctgcatggga tggatgacct ggagagagaa 3120
gtgttagagt ggaggttga cagccgcta gcatttcac acgtggcccg agagctgcat 3180
ccggagtact tcaagaactg ctga 3204

```

<210> 2
 <211> 1067
 <212> PRT
 <213> VIH

<400> 2

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

5

10

ES 2 609 418 T3

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

ES 2 609 418 T3

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

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

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
 325 330 335

Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
 340 345 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu 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

ES 2 609 418 T3

				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				

ES 2 609 418 T3

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
 1010 1015 1020

Ser Leu Leu His Pro Val Ser Leu His Gly Met Asp Asp Pro Glu
 1025 1030 1035

Arg Glu Val Leu Glu Trp Arg Phe Asp Ser Arg Leu Ala Phe His
 1040 1045 1050

His Val Ala Arg Glu Leu His Pro Glu Tyr Phe Lys Asn Cys
 1055 1060 1065

<210> 3
 <211> 4665
 <212> ADN
 <213> VIH
 <400> 3

atggccgcca gagccagcat cctgagcggg ggcaagctgg acgcctggga gaagatcaga 60
 ctgaggcctg gcggaagaa gaagtaccgg ctgaagcacc tgggtgggc cagcagagag 120
 ctggatcgct tcgccctgaa tcttagcctg ctggagacca ccgagggctg ccagcagatc 180

5
 10

ES 2 609 418 T3

atgaaccagc tgcagcccgc cgtgaaaacc ggcaccgagg agatcaagag cctgttcaac 240
 accgtggcca ccctgtactg cgtgcaccag cggatcgacg tgaaggatac caaggaggcc 300
 ctggacaaga tcgaggagat ccagaacaag agcaagcaga aaaccagca ggccgctgcc 360
 gacaccggcg acagcagcaa agtgagccag aactacecca tcatccagaa tgcccagggc 420
 cagatgatcc accagaacct gagccccaga accctgaatg cctgggtgaa agtgatcgag 480
 gaaaaggcct tcagccccga agtgatccct atgttcagcg ccctgagcga gggcgccacc 540
 ccccaggacc tgaacgtgat gctgaacatt gtgggaggac accaggccgc catgcagatg 600
 ctgaaggaca ccatcaatga ggaggccgcc gagtgggaca gactgcaccc cgtgcaggcc 660
 ggaccatcc cccctggcca gatcagagag cccagaggca gcgacatcgc cggcaccacc 720
 tccaccctc aagaacagct gcagtggatg accggcaacc ctccatccc tgtgggcaac 780
 atctacaagc ggtggatcat cctgggctg aacaagattg tgcggatgta cagccccgtg 840
 tccatcctgg atatcaagca gggcccaag gagccctca gagactacgt ggaccggttc 900
 ttcaaggccc tgagagccga gcaggccacc caggacgtga agggctggat gaccgagacc 960
 ctgctggtgc agaacgcca ccccgactgc aagagcatcc tgaaggccct gggcagcggc 1020
 gccacactgg aggagatgat gaccgctgc cagggagtgg gcggaccgg ccacaaggcc 1080
 agagtgc tgg ccgaggccat gagccaggcc cagcagacca acatcatgat gcagcggggc 1140
 aacttcagag gccagaagcg gatcaagtgc ttcaactgcg gcaaggaggg ccacctggcc 1200
 agaaactgca gagccccag gaagaaggc tgctggaagt gtggcaagga agggcaccag 1260
 atgaaggact gcaccgagag gcaggccaat ttctgggca agatttgcc tagcagcaag 1320
 ggcagaccg gcaatttccc ccagagcaga cccgagccca ccgcccctcc cgccgagctg 1380
 ttcggcattg gcgagggcat cgccagcctg cccaagcagg agcagaagga cagagagcag 1440
 gtgcccccc tgggtgctcct gaagtccctg ttgggcaacg atcctctgag ccagggatcc 1500
 cccatcagcc ccatcgagac cgtgcccgtg accctgaagc ccggcatgga tggccccaaa 1560
 gtgaaacagt gggccctgac cgaggagaag attaaggccc tgaccgaaat ctgtaccgag 1620
 atggagaagg agggcaagat cagcaagatc ggccccgaga acccctaca caccctcctc 1680
 ttcgccatca agaagaagga cagcacciaag tggcggaac tgggtggactt ccgggagctg 1740
 aacaagagga cccaggactt ctgggaagtg cagctgggca tccccacc tgccggcctg 1800
 aagaagaaga agtccgtgac agtgctggat gtgggagcag cctacttcag cgtgcccctg 1860
 gacgagaact tcaggaagta caccgcttc accatcccc gaccaaca cgagaccccc 1920
 ggagtgagat accagtaca cgtgctgcct cagggtgga agggcagccc cgccatcttc 1980
 cagagcagca tgaccaagat cctggagccc ttccggagca agaaccgga gatcatcatc 2040
 taccagtaca tggccgccc gtatgtgggc agcgtctgg agatcggcca gcacaggacc 2100
 aagatcgaag agctgagggc ccacctgctg agctggggct tcaccacccc cgataagaag 2160
 caccagaagg agccccctt cctgtggatg ggctacgagc tgcaccccga taagtggacc 2220

ES 2 609 418 T3

gtgcagccca	tcattgctgcc	cgataaggag	agctggaccg	tgaacgacat	ccagaaactg	2280
gtgggcaagc	tgaattgggc	cagccaaatc	tacgccggca	ttaaagtga	gcagctgtgc	2340
aggctgctga	gaggcgccaa	agccctgaca	gacatcgtga	cactgacaga	ggaggccgag	2400
ctggagctgg	ccgagaacag	ggagatcctg	aaggaccccc	tgcacggcgt	gtactacgac	2460
cccagcaagg	acctggtggc	cgagattcag	aagcagggcc	aggaccagtg	gacctaccaa	2520
atctaccagg	agcctttcaa	gaacctgaaa	accgggaagt	acgccaggaa	gagaagcgcc	2580
cacaccaacg	atgtgaggca	gctggccgaa	gtggtgcaga	aagtggctat	ggagagcatc	2640
gtgatctggg	gcaagacccc	caagttcaag	ctgccatcc	agaaggagac	ctgggaaacc	2700
tggtgatgg	actactggca	ggccacctgg	attcctgagt	gggagttcgt	gaacaccccc	2760
cctctggtga	agctgtggtg	tcagctggag	aaggacccca	tcctgggctc	cgagaccttc	2820
tacgtggacg	gagccgcca	tagagagacc	aagctgggca	aggccggcta	cgtgaccgac	2880
agaggcagac	agaaagtgg	gtctctgacc	gagacaacca	accagaaaac	cgagctgcac	2940
gccatcctgc	tggccctgca	ggacagcggc	agcgaagtga	acatcgtgac	cgactcccag	3000
tacgccctgg	gcatcattca	ggcccagccc	gatagaagcg	agagcgagct	ggtgaaccag	3060
atcatcgaga	agctgatcgg	caaggacaaa	atctacctga	gctgggtgcc	cgcccacaag	3120
ggcatcggcg	gcaacgagca	ggtggacaag	ctggtgtcca	gcgccatccg	gaaagtgctg	3180
tttctggacg	gcatcgacaa	ggcccaggag	gaccacgaga	gataccacag	caactggcgg	3240
acaatggcca	gcgacttcaa	cctgcctccc	atcgtggcca	aggagatcgt	ggccagctgc	3300
gataagtgtc	agctgaaggg	cgaggccatg	cacggccagg	tggactgcag	ccctggcatc	3360
tggcagctgg	cctgcaccca	cctggagggc	aaagtgatcc	tgggtggccgt	gcacgtggcc	3420
agcggctaca	tcgaggccga	agtgattccc	gccgagaccg	gccaggagac	cgctacttc	3480
ctgctgaagc	tggccggcag	atggcccgtg	aaagtgggtg	acaccgcca	cggcagcaac	3540
ttcacctctg	ccgccgtgaa	ggccgcctgt	tggtgggcca	atatccagca	ggagtccggc	3600
atccccata	accctcagag	ccagggcgtg	gtggccagca	tgaacaagga	gctgaagaag	3660
atcatcggcc	aggtgaggga	ccagggccgag	cacctgaaaa	cagccgtgca	gatggccgtg	3720
ttcatccaca	acttcaagcg	gaagggcggc	attggcggct	acagcggcgg	agagcggatc	3780
atcgacatca	tcgccaccga	tatccagacc	aaggaactgc	agaagcagat	caccaagatt	3840
cagaacttca	gagtgtacta	ccgggacagc	agggacccca	tctggaagg	ccctgccaa	3900
ctgctgtgga	agggcgaagg	cgccgtggtg	atccaggaca	acagcgacat	caaagtgggtg	3960
ccccggagga	aggccaagat	tctgcgggac	tacggcaaac	agatggccgg	cgatgactgc	4020
gtggccggca	ggcaggatga	ggacagatct	atgggcggca	agtgggtcca	gggcagcatt	4080
gtgggctggc	ccgagatccg	ggagagaatg	agaagagccc	ctgccgccc	tcctggagtg	4140
ggcgcctgtg	ctcaggatct	ggataagcac	ggcgccatca	ccagcagcaa	catcaacaac	4200
cccagctgtg	tgtggctgga	ggcccaggaa	gaggaggaag	tgggcttccc	tgtgagcccc	4260
caggtgcccc	tgagaccat	gacctacaag	ggcgccttcg	acctgagcca	cttcctgaag	4320

ES 2 609 418 T3

gagaagggcg gcctggacgg cctgatctac agccggaagc ggcaggagat cctggatctg 4380
 tgggtgtacc acaccaggg ctacttcccc gactggcaga attacacccc tggccctgga 4440
 gtgCGgtatc ccctgacctt cggctgggtgc ttcaagctgg tgcctatgga gcccgacgaa 4500
 gtggagaagg ccacagaggg cgagaacaac agcctgctgc accctatctg ccagcacggc 4560
 atggacgatg aggagcggga agtgctgatc tggaagtctg acagcaggct ggccctgaag 4620
 cacagagccc aggaactgca cccagagttc tacaaggact gctga 4665

<210> 4
 <211> 1554
 <212> PRT
 <213> VIH
 <400> 4

5

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

10

ES 2 609 418 T3

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
 210 220

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

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
 385 390 400

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
 450 455 460

Glu Gly Ile Ala Ser Leu Pro Lys Gln Glu Gln Lys Asp Arg Glu Gln

ES 2 609 418 T3

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
 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
 1010 1015 1020

ES 2 609 418 T3

Lys Leu Ile Gly Lys Asp Lys Ile Tyr Leu Ser Trp Val Pro Ala
 1025 1030 1035
 His Lys Gly Ile Gly Gly Asn Glu Gln Val Asp Lys Leu Val Ser
 1040 1045 1050
 Ser Gly Ile Arg Lys Val Leu Phe Leu Asp Gly Ile Asp Lys Ala
 1055 1060 1065
 Gln Glu Asp His Glu Arg Tyr His Ser Asn Trp Arg Thr Met Ala
 1070 1075 1080
 Ser Asp Phe Asn Leu Pro Pro Ile Val Ala Lys Glu Ile Val Ala
 1085 1090 1095
 Ser Cys Asp Lys Cys Gln Leu Lys Gly Glu Ala Met His Gly Gln
 1100 1105 1110
 Val Asp Cys Ser Pro Gly Ile Trp Gln Leu Ala Cys Thr His Leu
 1115 1120 1125
 Glu Gly Lys Val Ile Leu Val Ala Val His Val Ala Ser Gly Tyr
 1130 1135 1140
 Ile Glu Ala Glu Val Ile Pro Ala Glu Thr Gly Gln Glu Thr Ala
 1145 1150 1155
 Tyr Phe Leu Leu Lys Leu Ala Gly Arg Trp Pro Val Lys Val Val
 1160 1165 1170
 His Thr Ala Asn Gly Ser Asn Phe Thr Ser Ala Ala Val Lys Ala
 1175 1180 1185
 Ala Cys Trp Trp Ala Asn Ile Gln Gln Glu Phe Gly Ile Pro Tyr
 1190 1195 1200
 Asn Pro Gln Ser Gln Gly Val Val Ala Ser Met Asn Lys Glu Leu
 1205 1210 1215
 Lys Lys Ile Ile Gly Gln Val Arg Asp Gln Ala Glu His Leu Lys
 1220 1225 1230
 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
 1250 1255 1260
 Ile Ala Thr Asp Ile Gln Thr Lys Glu Leu Gln Lys Gln Ile Thr
 1265 1270 1275

Lys Ile Gln Asn Phe Arg Val Tyr Tyr Arg Asp Ser Arg Asp Pro
 1280 1285 1290
 Ile Trp Lys Gly Pro Ala Lys Leu Leu Trp Lys Gly Glu Gly Ala
 1295 1300 1305
 Val Val Ile Gln Asp Asn Ser Asp Ile Lys Val Val Pro Arg Arg
 1310 1315 1320
 Lys Ala Lys Ile Leu Arg Asp Tyr Gly Lys Gln Met Ala Gly Asp
 1325 1330 1335
 Asp Cys Val Ala Gly Arg Gln Asp Glu Asp Arg Ser Met Gly Gly
 1340 1345 1350
 Lys Trp Ser Lys Gly Ser Ile Val Gly Trp Pro Glu Ile Arg Glu
 1355 1360 1365
 Arg Met Arg Arg Ala Pro Ala Ala Ala Pro Gly Val Gly Ala Val
 1370 1375 1380
 Ser Gln Asp Leu Asp Lys His Gly Ala Ile Thr Ser Ser Asn Ile
 1385 1390 1395
 Asn Asn Pro Ser Cys Val Trp Leu Glu Ala Gln Glu Glu Glu
 1400 1405 1410
 Val Gly Phe Pro Val Arg Pro Gln Val Pro Leu Arg Pro Met Thr
 1415 1420 1425
 Tyr Lys Gly Ala Phe Asp Leu Ser His Phe Leu Lys Glu Lys Gly
 1430 1435 1440
 Gly Leu Asp Gly Leu Ile Tyr Ser Arg Lys Arg Gln Glu Ile Leu
 1445 1450 1455
 Asp Leu Trp Val Tyr His Thr Gln Gly Tyr Phe Pro Asp Trp Gln
 1460 1465 1470
 Asn Tyr Thr Pro Gly Pro Gly Val Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly
 1475 1480 1485
 Trp Cys Phe Lys Leu Val Pro Met Glu Pro Asp Glu Val Glu Lys
 1490 1495 1500
 Ala Thr Glu Gly Glu Asn Asn Ser Leu Leu His Pro Ile Cys Gln
 1505 1510 1515
 His Gly Met Asp Asp Glu Glu Arg Glu Val Leu Ile Trp Lys Phe
 1520 1525 1530
 Asp Ser Arg Leu Ala Leu Lys His Arg Ala Gln Glu Leu His Pro

1535

1540

1545

Glu Phe Tyr Lys Asp Cys
1550

<210> 5
<211> 2025
<212> ADN
<213> VIH

5

<400> 5

```

atgaggggtga tggagatcca gcggaactgc cagcacctgc tgagatgggg catcatgac      60
ctgggcatga ttatcatctg cagcaccgcc gacaacctgt gggtgaccgt gtactacggc      120
gtgcctgtgt ggagagatgc cgagaccacc ctgttctgcg ccagcgacgc caaggcctac      180
agcaccgaga agcacaatgt gtgggccacc cacgcctgcg tgccctaccga tcccaaccct      240
caggagatcc ccctggacaa cgtgaccgag gagttcaaca tgtggaagaa caacatggtg      300
gaccagatgc acgaggacat catcagcctg tgggaccaga gcctgaagcc ctgctgacag      360
ctgaccccc tgtgctgtgac cctgaactgc agcaacgccca gagtgaacgc caccttcaac      420
tccaccgagg acagggaggg catgaagaac tgcagcttca acatgaccac cgagctgcgg      480
gataagaagc agcaggtgta cagcctgttc taccggctgg acatcgagaa gatcaacagc      540
agcaacaaca acagcgagta ccggctggtg aactgcaata ccagcgccat caccagggcc      600
tgccctaagg tgaccttcca gcccatcccc atccactact gcgccccctgc cggettccgc      660
atcctgaagt gcaacgacac cgagttcaat ggcaccggcc cctgcaagaa tgtgagcacc      720
gtgcagtgca cccacggcat caagcccgtg gtgtccaccc agctgctgct gaacggcagc      780
ctggccgaga gagaagtgcg gatcaggagc gagaacatcg ccaacaacgc caagaacatc      840
atcgtgcaat tgcagcacc cgtgaagatc aactgcatcc ggcccaacaa caatacccgg      900
aagagctaca gaatcggccc tggccagacc ttctacgcca ccgacattgt gggcgacatc      960
agacaggccc actgcaacgt gtccaggacc gactggaaca acaccctgag actggtggcc      1020
aaccagctgc ggaagtactt cagcaacaag accatcatct tcaccaacag cagcggcgga      1080
gacctggaga tcaccacca cagcttcaat tgtggcggcg agttcttcta ctgcaacacc      1140
tccggcctgt tcaatagcac ctggaccacc aacaacatgc aggagtcca cgacaccagc      1200
aacggcacca tcacctgcc ctgcccgatc aagcagatca tccggatgtg gcagcgcgtg      1260
ggccaggcca tgtacgcccc tcccatcgag ggcgtgattc gctgagagag caacatcacc      1320
ggcctgatcc tgaccagaga tggcggcaac aacaattccg ccaacgagac cttcagacct      1380
ggcggcggag atatccgga caactggcgg agcgagctgt acaagtaca ggtggtgaag      1440
atcgagcccc tgggcgtggc ccccaccaga gccaaagaaa gagtgggtgga gcgggagaag      1500
agagccgtgg gcatcggcgc cgtgtttctg ggcttctctg gagccgccgg atctacaatg      1560
ggagccgcca gcatcacctt gaccgtgacg gccagacagc tgctgagcgg catcgtgacg      1620
cagcagagca atctgctgag agccatcgag gccacgacgc agctgctgaa gctgacagtg      1680

```

10

ES 2 609 418 T3

tggggcatca agcagctgca ggccaggggtg ctggccgtgg agagatacct gagggaccag 1740
 cagctcctgg gcatctgggg ctgcagcggc aagctgatct gcaccaccaa cgtgccctgg 1800
 aatagcagct ggagcaacaa gagctacgac gacatctggc agaacatgac ctggctgcag 1860
 tgggacaagg agatcagcaa ctacaccgac atcatctaca gcctgatcga ggagagccag 1920
 aaccagcagg agaagaacga gcaggatctg ctggccctgg acaagtgggc caacctgtgg 1980
 aactggttcg acatcagcaa gtggctgtgg tacatcagat cttga 2025

<210> 6
 <211> 674
 <212> PRT
 <213> VIH

 <400> 6

5

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
 130 135 140

 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

10

ES 2 609 418 T3

	195					200					205							
Ile	Pro 210	Ile	His	Tyr	Cys	Ala 215	Pro	Ala	Gly	Phe	Ala 220	Ile	Leu	Lys	Cys			
Asn	Asp	Thr	Glu	Phe	Asn 230	Gly	Thr	Gly	Pro	Cys 235	Lys	Val	Ser	Thr	240			
Val	Gln	Cys	Thr	His 245	Gly	Ile	Lys	Pro	Val 250	Val	Ser	Thr	Gln	Leu 255	Leu			
Leu	Asn	Gly	Ser 260	Leu	Ala	Glu	Arg	Glu 265	Val	Arg	Ile	Arg	Ser 270	Glu	Asn			
Ile	Ala	Asn 275	Asn	Ala	Lys	Asn	Ile 280	Ile	Val	Gln	Phe	Ala 285	Ser	Pro	Val			
Lys	Ile 290	Asn	Cys	Ile	Arg	Pro 295	Asn	Asn	Asn	Thr	Arg 300	Lys	Ser	Tyr	Arg			
Ile	Gly	Pro	Gly	Gln	Thr 310	Phe	Tyr	Ala	Thr	Asp 315	Ile	Val	Gly	Asp	Ile 320			
Arg	Gln	Ala	His	Cys 325	Asn	Val	Ser	Arg	Thr 330	Asp	Trp	Asn	Asn	Thr 335	Leu			
Arg	Leu	Val	Ala 340	Asn	Gln	Leu	Arg	Lys 345	Tyr	Phe	Ser	Asn	Lys 350	Thr	Ile			
Ile	Phe	Thr 355	Asn	Ser	Ser	Gly	Gly 360	Asp	Leu	Glu	Ile	Thr 365	Thr	His	Ser			
Phe	Asn 370	Cys	Gly	Gly	Glu	Phe 375	Phe	Tyr	Cys	Asn	Thr 380	Ser	Gly	Leu	Phe			
Asn	Ser	Thr	Trp	Thr	Thr 390	Asn	Asn	Met	Gln	Glu 395	Ser	Asn	Asp	Thr	Ser 400			
Asn	Gly	Thr	Ile	Thr 405	Leu	Pro	Cys	Arg	Ile 410	Lys	Gln	Ile	Ile	Arg 415	Met			
Trp	Gln	Arg	Val 420	Gly	Gln	Ala	Met	Tyr 425	Ala	Pro	Pro	Ile	Glu 430	Gly	Val			
Ile	Arg	Cys 435	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr 440	Gly	Leu	Ile	Leu	Thr 445	Arg	Asp	Gly			
Gly	Asn 450	Asn	Asn	Ser	Ala	Asn 455	Glu	Thr	Phe	Arg	Pro 460	Gly	Gly	Gly	Asp			
Ile	Arg	Asp	Asn	Trp	Arg 470	Ser	Glu	Leu	Tyr	Lys 475	Tyr	Lys	Val	Val	Lys 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
 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> VIH
 <400> 7

5

atgaaagtga aggagaccag gaagaattat cagcacttgt ggagatgggg caccatgctc 60
 cttgggatgt tgatgatctg tagtgctgca gaacaattgt gggtcacagt ctattatggg 120
 gtacctgtgt ggaaagaagc aactaccact ctattctgtg catcagatgc taaagcatat 180
 gatacagagg tacataatgt ttgggccaca catgcctgtg taccacacaga ccccaaccca 240
 caagaagtag tattgggaaa tgtgacagaa tattttaaca tgtggaaaaa taacatggta 300

10

gaccagatgc atgaggatat aatcagttta tgggatcaaa gcttgaagcc atgtgtaaaa 360
 ttaacccac tctgtgttac tttagattgc gatgatgtga ataccactaa tagtactact 420
 accactagta atggttggac aggagaaata aggaaaggag aaataaaaaa ctgctctttt 480
 aatatcacca caagcataag agataaggtt caaaaagaat atgcactttt ttataacctt 540
 gatgtagtac caatagatga tgataatgct actaccaaaa ataaaactac tagaaacttt 600
 aggttgatac attgtaactc ctcagtcacg acacaggcct gtccaaaggt atcatttgaa 660
 ccaattccca tacattattg tgccccggct ggttttgcg tttctgaagtg taacaataag 720
 acgtttgatg gaaaaggact atgtacaat gtcagcacag tacaatgtac acatggaatt 780
 aggccagtag tgtcaactca actgctgtta aatggcagtc 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 atttaatcaa tcctcaggag gggaccaga aattgtaagg 1140
 catagtctta attgtggagg ggaatttttc tactgtgata caacacaact gtttaatagt 1200
 acttggaatg gtactgaagg aaataacact gaaggaaata gcacaatcac actcccatgt 1260
 agaataaac aaattataaa catgtggcag gaagtaggaa aagcaatgta tgcccctccc 1320
 atcggaggac aaattagatg ttcatcaaat attacagggc tgctattaac aagagatggt 1380
 ggtaccgaag ggaatgggac agagaatgag acagagatct tcagacctgg aggaggagat 1440
 atgagggaca attggagaag tgaattatat aaatataaag tagtaaaagt tgaaccacta 1500
 ggagtagcac ccaccagggc aaagagaaga gtggtgcaga gataa 1545

<210> 8
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> 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

10

ES 2 609 418 T3

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
100 105 110

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
 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
 <212> ADN
 <213> *Mycobacterium tuberculosis*

5

<400> 9

atgcatcaca cggccgcgtc cgataacttc cagctgtccc aggggtgggca gggattcgcc 60
 attccgatcg ggcagggcat ggcgatcgcg ggccagatcc gatcgggtgg ggggtcacc 120
 accgttcata tcgggcctac cgcttcctc ggcttgggtg ttgtcgacaa caacggcaac 180
 ggcgcacgag tccaacgcgt ggtcgggagc gctccggcgg caagtctcgg catctccacc 240
 ggcgacgtga tcaccgcggt cgacggcgct ccgatcaact cggccaccgc gatggcggac 300
 gcgcttaacg ggcatcatcc cggtgacgtc atctcgggtga cctggcaaac caagtcgggc 360
 ggcacgcgta cagggaaagt gacattggcc gagggacccc cggccgaatt catggtggat 420
 ttcggggcgt taccaccgga gatcaactcc gcgaggatgt acgccggccc gggttcggcc 480
 tcgctggtgg ccgcggctca gatgtgggac agcgtggcga gtgacctgtt ttcggccgcg 540

10

ES 2 609 418 T3

tcggcgtttc agtcgggtgt ctggggctcg acgggtgggt cgtggatagg ttcgtcggcg 600
 ggtctgatgg tggcggcggc ctcccgctat gtggcgtgga tgagcgtcac cgcggggcag 660
 gccgagctga ccgccgccca ggtccgggtt gctgcggcgg cctacgagac ggcgtatggg 720
 ctgacgggtgc ccccgccggt gatcgcggag aaccgtgctg aactgatgat tctgatagcg 780
 accaacctct tggggcaaaa caccggcg atcgcggta acgaggccga atacggcgag 840
 atgtggggcc aagacgccgc cgcgatggtt ggctacccg cggcgacggc gacggcgacg 900
 gcgacgttgc tgccgttca ggaggcggc gagatgacca gcgcgggtgg gtcctcagag 960
 caggccggcg cggtcgagga ggcctcagc accgcggcg cgaaccagtt gatgaacaat 1020
 gtccccagg cgtgcaaca gctggcccag cccacgagg gcaccagcc ttctccaag 1080
 ctgggtggcc tgtggaagac ggtctcggc catcggctgc cgatcagcaa catggtgtcg 1140
 atggccaaca accacatgtc gatgaccaac tcgggtgtgt cgatgaccaa caccttgagc 1200
 tcgatgttga agggcttgc tccggcggc gccgcccagg ccgtgcaaac cgcggcga 1260
 aacggggtcc gggcgatgag ctccgctggc agctcgttg gttcttcggg tctggcggt 1320
 ggggtggccg ccaacttggg tcggcgggc tcggtcggtt cgttgcggt gccgcaggcc 1380
 tgggccggc ccaaccaggc agtcacccg gcggcgggg cgtgcggct gaccagcctg 1440
 accagcggc cggaaagagg gcccgggcag atgctggcg ggctgccgt ggggcagatg 1500
 ggcgccaagg ccgggtgtg gctcagtgt gtgctgcgt ttccggcgg accctatgtg 1560
 atgccgatt ctccggcagc cggcgatgc gcccccggc ccttgcgca ggaccggttc 1620
 gccgacttc ccgcgctgcc cctcgaccg tccgcgatg tcgccaagt ggggccacag 1680
 gtgtcaaca tcaacaccaa actgggctac aacaacggc tgggcggcg gaccggcatc 1740
 gtcatcgatc ccaacggtg cgtgctgacc aacaaccag tgatcgggg gccaccgac 1800
 atcaatgct tcagcgtcg ctccggccaa acctacggc tcgatgtgt cgggtatgac 1860
 cgcacccagg atgtcgggt gctgcagct cgcggtgcc gtggcctgcc gtcggcggcg 1920
 atcgggtggc gcgtcgggt tggtagccc gtcgtcgcga tgggcaacag cgggtggcag 1980
 ggcggaacgc cccgtcgggt gcctggcagg gtggtcgcg tcggccaac cgtgcaggcg 2040
 tcggattcgc tgaccggtgc cgaagagaca ttgaacgggt tgatccagtt cgatgccggc 2100
 atccagccc gtgatcggg cgggcccgtc gtcaacggc taggacaggt ggtcggtatg 2160
 aacacggccg cgtcctag 2178

<210> 10
 <211> 725
 <212> PRT
 <213> *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

5

10

ES 2 609 418 T3

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
 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 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> *Plasmodium falciparum*
 <400> 11

atgatgagaa aacttgccat cctcagcgtc agctctttcc tgttcgtgga ggccctcttc 60
 caggagtatc agtgctacgg aagcagcagc aatacaaggg tcctgaacga gctcaactat 120
 gacaacgctg gaacgaacct gtataacgag ctggagatga actactatgg caagcaggag 180
 aactggtata gcctgaagaa gaacagccgg tccttgggcg agaacgacga cggcaacaac 240
 aacaacggcg acaacggcag ggagggcaaa gatgaggaca agagggacgg gaacaacgag 300
 gataacgaga agctgcgga gccaagcac aagaaactca agcagcccgc cgacgggaac 360
 ccggacccca atgcaaatcc caacgtcgac ccaaacgcaa accctaactg ggaccccaac 420
 gccaatccca acgtcgatcc taatgccaat ccaaatgcca accctaacgc aaatccta 480
 gcaaacccca acgccaatcc taacgccaac ccaaatgcca acccaaacgc taaccccaac 540
 gctaacccaa atgcaaatcc caatgctaac ccaaacgtgg accctaacgc taaccccaac 600
 gcaaacccta acgccaatcc taacgccaac ccaatgcaa acccaaacgc aaatcccaac 660

10

ES 2 609 418 T3

```

gctaacccta acgcaaacc caacgccaac cctaatgcc accccaatgc taacccaac      720
gccaatccaa acgcaaatcc aaacgccaac ccaaatgcaa accccaacgc taatccaac      780
gccaacccaa acgccaatcc taacaagaac aatcagggca acgggcaggg ccataacatg      840
ccgaacgacc ctaatcggaa tgtggacgag aacgccaacg ccaacagcgc cgtgaagaac      900
aacaacaacg aggagccctc cgacaagcac atcaaggaat acctgaacaa gatccagaac      960
agtctgagca ccgagtggtc cccctgctcc gtgacctgcg gcaacggcat ccaggtgagg     1020
atcaagcccg gctccgcaa caagcccaag gacgagctgg actacgcaa cgacatcgag     1080
aagaagatct gcaagatgga gaaatgcagc tctgtgttca acgtcgtgaa ctccgccatc     1140
ggcctgtga                                     1149
    
```

5 <210> 12
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> *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
    
```

10

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 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

<210> 13
 <211> 1275
 <212> ADN
 <213> *Plasmodium falciparum*

5

<400> 13

atgatggctc cccgatcctaa tgcaaatcca aatgcaaacc caaacgcaaa ccccaatgca 60
 aatcctaatag caaaccccaa tgcaaatcct aatgcaaatac ctaatgccaa tccaaatgca 120
 aatccaaatg caaacccaaa cgcaaacccc aatgcaaatac ctaatgccaa tccaaatgca 180
 aatccaaatg caaacccaaa tgcaaaccca aatgcaaacc ccaatgcaaa tcctaataaa 240
 aacaatcaag gtaatggaca aggtcacaaat atgccaatag acccaaaccg aatgtagat 300

10

```

gaaaatgcta atgccaacag tgctgtaaaa aataataata acgaagaacc aagtgataag      360
cacataaaag aatatttaa caaaatacaa aattctcttt caactgaatg gtcccccattgt      420
agtgtaaact gtggaaatgg tattcaagtt agaataaagc ctggctctgc taataaacct      480
aaagacgaat tagattatgc aatgatatt gaaaaaaaaa tttgtaaaat ggaaaaatgt      540
tccagtgtgt ttaatgtcgt aatagttca ataggattag ggcctgtgac gaacatggag      600
aacatcacat caggattcct aggaccctcg ctctgtttac aggcgggggt tttcttgttg      660
acaagaatcc tcacaatacc gcagagtcta gactcgtggt ggacttctct caattttcta      720
gggggatcac ccgtgtgtct tggccaaaat tcgcagtcce caacctcaa tcaactacca      780
acctctctgc ctccaattg tctctggtat cgctggatgt gtctgcggcg ttttatcata      840
ttctcttca tctctgtcgt atgcctcatc ttcttattgg ttcttctgga ttatcaaggt      900
atgttgcccg tttgtcctct aattccagga tcaacaacaa ccaatacggg accatgcaaa      960
acctgcacga ctctgtcctc aggcaactct atgtttccct catgttgctg taaaaacct     1020
acggatggaa attgcacctg tattcccatc ccctcgtcct gggctttcgc aaaataccta     1080
tgggagtggg cctcagtcct tttctcttgg ctctagttac tagtgccatt tgttcagtgg     1140
ttcgtagggc tttccccac tgtttggctt tcagctatat ggatgatgtg gtattggggg     1200
ccaagtctgt acagcatcgt gagtcccttt ataccgctgt taccaatttt cttttgtctc     1260
tgggtataca tttaa
                                                                                   1275

```

<210> 14
 <211> 424
 <212> PRT
 <213> *Plasmodium falciparum*
 <400> 14

5

```

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

```

10

ES 2 609 418 T3

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

ES 2 609 418 T3

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

<210> 15
 <211> 3411
 <212> ADN
 <213> VIH

5

<400> 15

atggtcattg ttcagaacat acagggccaa atgggtccacc aggcaattag tccgcgaact 60
 cttaatgcat gggatgaagg cgtggaggaa aaggcattct ccccgagggt cattccgatg 120
 ttttctgctg tatctgaggg cgcaacgccg caagacctta ataccatgct taacacggta 180
 ggcgggcacc aagccgctat gcaaatgcta aaagagacta taaacgaaga ggccgccgaa 240
 tgggatcgag tgcacccggg gcacgccggc ccaattgcac caggccagat gcgcgagccg 300
 cgccgggtctg atattgcagg aactacgtct acccttcagg agcagattgg gtggatgact 360
 aacaatccac caatcccggg cggagagatc tataagaggt ggatcatact gggactaaac 420
 aagatagttc gcatgtattc tccgacttct atactggata tacgccaagg cccaaaggag 480
 ccgttcaggg actatgtcga ccgattctat aagacccttc gcgcagagca ggcattccag 540
 gaggtcaaaa attggatgac agaaactctt ttgggtgcaga atgcgaatcc ggattgtaaa 600
 acaattttaa aggtcttagg accggccgca acgctagaag agatgatgac ggcttgctcag 660
 ggagtcggtg gaccggggca taaagcccgc gtcttacaca tgggcccgat atctccgata 720
 gaaacagttt cggtaagct taaaccaggg atggatggtc caaaggtaaa gcagtgcccg 780
 ctaacggaag agaagattaa ggcgctcgta gagatttcta ctgaaatgga gaaggaaggc 840
 aagataagca agatcggggc agagaaccgc tacaatacac cggatattgc aataaagaaa 900
 aaggattcaa caaatggcg aaagcttcta gattttaggg aactaaaca gcgaacccaa 960
 gacttttggg aagtccaact agggatccca catccagccg gtctaaagaa gaagaaatcg 1020
 gtcacagtcc tggatgtagg agacgatat 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 tgggctcggg tctagaaatt gggcagcatc gcactaagat tgaggaactg 1320
 aggcaacatc tgcttcgatg ggcctcact actcccgaca agaagcacca gaaggagccg 1380
 ccgttcctaa agatgggcta cgagcttcat ccggacaagt ggacagtaca gccgatagtg 1440
 ctgcccgaaa aggattcttg gaccgtaaat gatattcaga aactagtcgg caagcttaac 1500
 tgggcctctc agatttacc aggcattaag gtccgacagc tttgcaagct actgagggga 1560

10

ES 2 609 418 T3

actaaggctc taacagaggt catccatta acggaggaag cagagcttga gctggcagag 1620
 aatcgcgaaa ttcttaagga gccggtgac ggggtatact acgacccctc caaggacctt 1680
 atagccgaga tccagaagca ggggcagggc caatggacgt accagatata tcaagaaccg 1740
 ttaagaatc tgaagactgg gaagtacgcg cgcattgagc gggctcatac taatgatgta 1800
 aagcaactta cggaagcagt acaaaagatt actactgagt ctattgtgat atggggcaag 1860
 accccaaagt tcaagctgcc catacagaag gaaacatggg aaacatgggt gactgaaat 1920
 tggcaagcta cctggattcc agaatgggaa tttgtcaaca cgccgccact tgtaagctt 1980
 tggtagcagc ttgaaaagga gccgatagta ggggcagaga ccttctatgt cgatggcgcc 2040
 gcgaatcgcg aaacgaagct aggcaaggcg ggatacgtga ctaatagggg ccgccaaaag 2100
 gtcgtaacc ttacggatac caccaatcag aagactgaac tacaagcgat ttaccttgca 2160
 cttcaggata gtggcctaga ggtcaacata gtcacggact ctcaatatgc gcttggcatt 2220
 attcaagcgc agccagatca aagcgaagc gagcttgtaa accaaataat agaacagctt 2280
 ataaaga aag agaaggtata tctggcctgg gtccccgctc acaaggggat tggcggcaat 2340
 gagcaag tgg acaagctagt cagcgtggg attcgcaagg ttcttgcat ggggggtaag 2400
 tggcttaagt ctagcgtagt cggctggcgg acagtcgcg agcgcattgc acgcgccgaa 2460
 ccagccg cag atggcgtggg ggcagcgtct agggatctgg agaagcacgg ggctataact 2520
 tccagtaaca cggcggcgac gaacgccgca tgcgcattgt tagaagccca agaagaggaa 2580
 gaagtagggg ttccggtaac tccccagggt ccgttaaggc cgatgaccta taaggcagcg 2640
 gtggatctt ctcacttct taaggagaaa ggggggctgg agggcttaat tcacagccag 2700
 aggcgacagg atattcttga tctgtggatt taccataccc aggggtactt tccggactgg 2760
 cagaattaca ccccggggcc aggcgtgccc tatccctga ctttcgggtg gtgctacaaa 2820
 ctagtcccag tggaaccgca caaggtcgaa gaggctaata agggcgagaa cacttctctt 2880
 cttcaccgg taagcctgca cgggatggat gaccagaaac gagaggttct agaatggagg 2940
 ttcgactctc gacttgcgtt ccatcacgta gcacgcgagc tgcattcaga atatttcaag 3000
 aactgcccgc caatgggcgc cagggccagt gtacttagtg gcggagaact agatcgatgg 3060
 gaaaagatc gcctacgccc ggggggcaag aagaagtaca agcttaagca cattgtgtgg 3120
 gcctctcgcg aacttgagcg attcgcagt atccaggcc tgcttgagac gagtgaaggc 3180
 tgtaggcaaa ttctggggca gctacagccg agcctacaga ctggcagcga ggagcttcgt 3240
 agtctttata ataccgtcgc gactctctac tgcgttcac aacgaattga aataaaggat 3300
 actaaagagg cccttgataa aattgaggag gaacagaata agtcgaaaaa gaaggccag 3360
 caggccgccc ccgacaccgg gcacagcaac caggtgtccc aaaactacta a 3411

<210> 16
 <211> 1136
 <212> PRT
 <213> VIH
 <400> 16

5

ES 2 609 418 T3

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

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

ES 2 609 418 T3

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

ES 2 609 418 T3

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
 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

ES 2 609 418 T3

			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	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		
	1010					1015					1020					
Arg	Leu	Arg	Pro	Gly	Gly	Lys	Lys	Lys	Tyr	Lys	Leu	Lys	His	Ile		
	1025					1030					1035					
Val	Trp	Ala	Ser	Arg	Glu	Leu	Glu	Arg	Phe	Ala	Val	Asn	Pro	Gly		
	1040					1045					1050					
Leu	Leu	Glu	Thr	Ser	Glu	Gly	Cys	Arg	Gln	Ile	Leu	Gly	Gln	Leu		
	1055					1060					1065					
Gln	Pro	Ser	Leu	Gln	Thr	Gly	Ser	Glu	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Tyr		
	1070					1075					1080					
Asn	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Tyr	Cys	Val	His	Gln	Arg	Ile	Glu	Ile		
	1085					1090					1095					

ES 2 609 418 T3

Lys Asp Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn
1100 1105 1110

Lys Ser Lys Lys Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly His
1115 1120 1125

Ser Asn Gln Val Ser Gln Asn Tyr
1130 1135

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de vacuna que comprende (i) uno o más primeros polipéptidos inmunógenos que comprenden uno o más antígenos del VIH seleccionados de Env, Nef, Gag y/o Pol, o un fragmento inmunógeno; (ii) uno o más vectores adenovirales que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más segundos polipéptidos inmunógenos que comprenden uno o más antígenos del VIH seleccionados de Env, Nef, Gag y/o Pol, o un fragmento inmunógeno; y (iii) un adyuvante que comprende 3D-MPL y QS21.
2. Una composición de vacuna según la reivindicación 1, en la que uno o más de dichos uno o más primeros polipéptidos inmunógenos es sustancialmente el mismo, o 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 .
- 10 3. Una composición de vacuna según cualquier reivindicación precedente, en la que el uno o más primeros polipéptidos inmunógenos comprende al menos un epítipo de linfocitos T y/o al menos un epítipo de linfocitos B.
4. Una composición de vacuna según cualquier reivindicación precedente, en la que 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 epítipos de linfocitos B y/o de linfocitos T idénticos.
- 15 5. Una composición de vacuna según cualquier reivindicación precedente, en la 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 dicho uno o más segundos polipéptidos inmunógenos.
6. Una composición de vacuna según cualquier reivindicación precedente, en la que uno o más de los vectores adenovirales se deriva de un adenovirus humano o un adenovirus de primate no humano.
- 20 7. Una composición de vacuna según la reivindicación 6, en la que el serotipo de adenovirus humano está seleccionado de Ad1, Ad2, Ad4, Ad5, Ad6, Ad11, Ad24, Ad34 y Ad35 y el serotipo de adenovirus de primate no humano está seleccionado de los serotipos de adenovirus de chimpancé Pan5, Pan6, Pan7 y Pan9.
8. Una composición de vacuna según la reivindicación 1, en la que un primer polipéptido inmunógeno es p24-RT-Nef-p17 y/o un segundo polipéptido inmunógeno es Gag-RT-Nef.
- 25 9. La composición de vacuna de la reivindicación 8, en la que el uno o más primeros polipéptidos inmunógenos y/o el uno o más segundos polipéptidos inmunógenos comprenden Env.
10. La composición de vacuna según cualquier reivindicación precedente, en la que el adyuvante comprende además CpG.
- 30 11. Una composición de vacuna según cualquier reivindicación precedente, en la que el adyuvante contiene una emulsión de aceite en agua, o en la que el adyuvante contiene liposomas.
12. Una composición de vacuna según cualquier reivindicación precedente para su uso en fomentar una respuesta inmunitaria frente al VIH o para su uso en estimular la producción de linfocitos T CD4+ y/o CD8+ específicos para el VIH y/o anticuerpos en mamíferos.
- 35 13. Uso de una composición de vacuna según cualquier reivindicación precedente en la fabricación de un medicamento para fomentar una respuesta inmunitaria frente al VIH o para estimular la producción de linfocitos T CD4+ y/o CD8+ específicos para el VIH y/o anticuerpos en mamíferos.
- 40 14. Un kit que comprende (i) uno o más primeros polipéptidos inmunógenos seleccionados de Env, Nef, Gag y/o Pol de VIH, o un fragmento inmunógeno; (ii) uno o más vectores adenovirales que comprenden uno o más polinucleótidos heterólogos que codifican uno o más segundos polipéptidos inmunógenos seleccionados de Env, Nef, Gag y/o Pol de VIH, o un fragmento inmunógeno; y (iii) un adyuvante que comprende 3D-MPL y QS21.
- 45 15. Una composición de vacuna, o uso, o kit según cualquier reivindicación precedente en la que el primer polipéptido inmunógeno comprende p24-RT-Nef-p17, el adyuvante comprende 3D-MPL y QS21 en una formulación liposomal, y el vector adenoviral comprende un vector de serotipo de adenovirus de chimpancé Pan7 que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido inmunógeno Gag-RT-Nef, opcionalmente de codón optimizado.
16. Una composición de vacuna, o uso, o kit según cualquier reivindicación precedente, en la que uno, o dos, o todos de los componentes de polipéptido, vector adenoviral y adyuvante se combinan con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Figura 2a

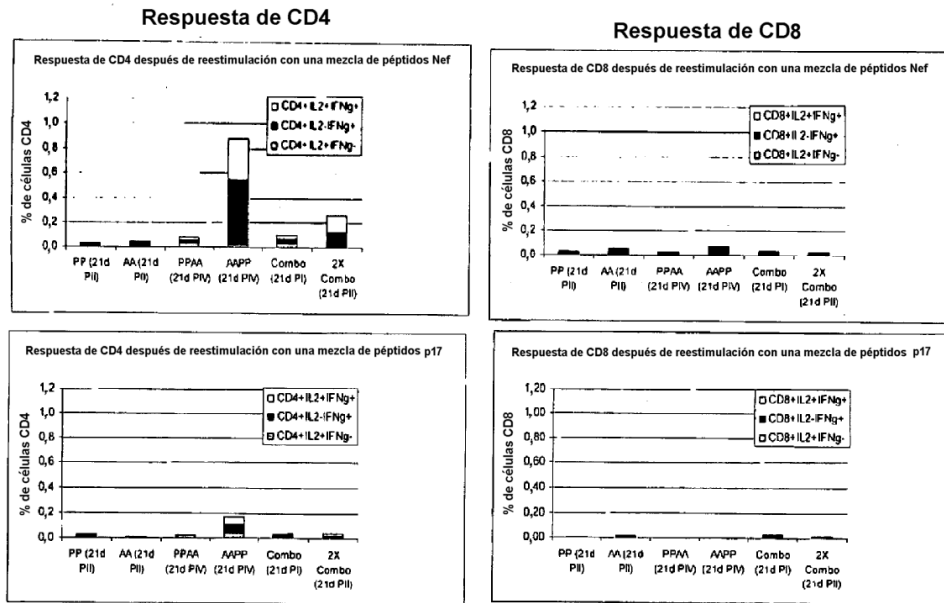


Figura 2b

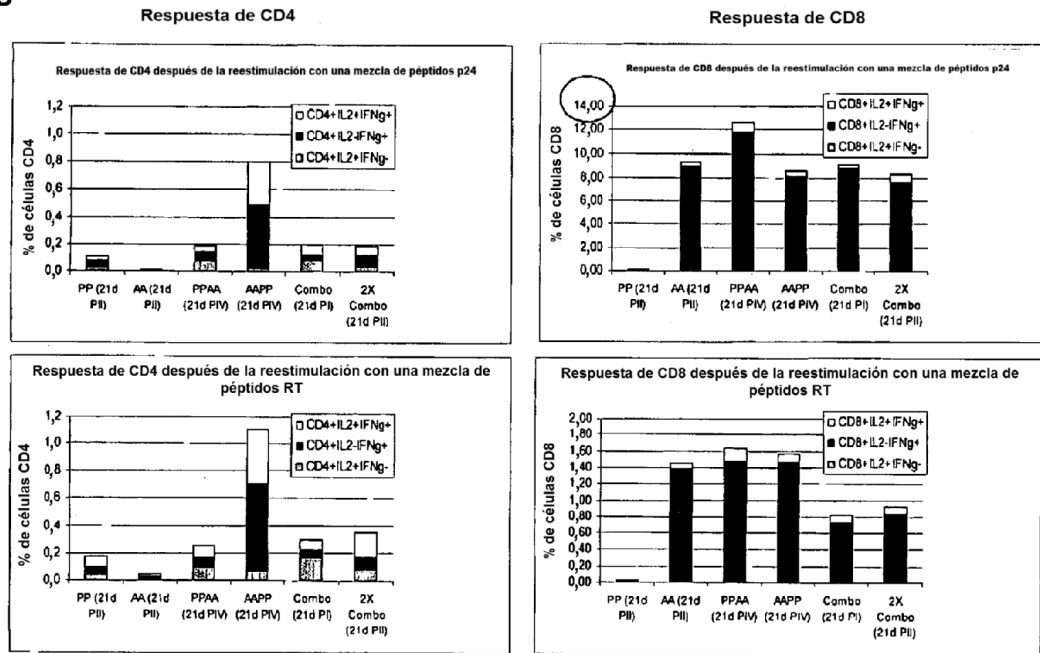


Figura 3b

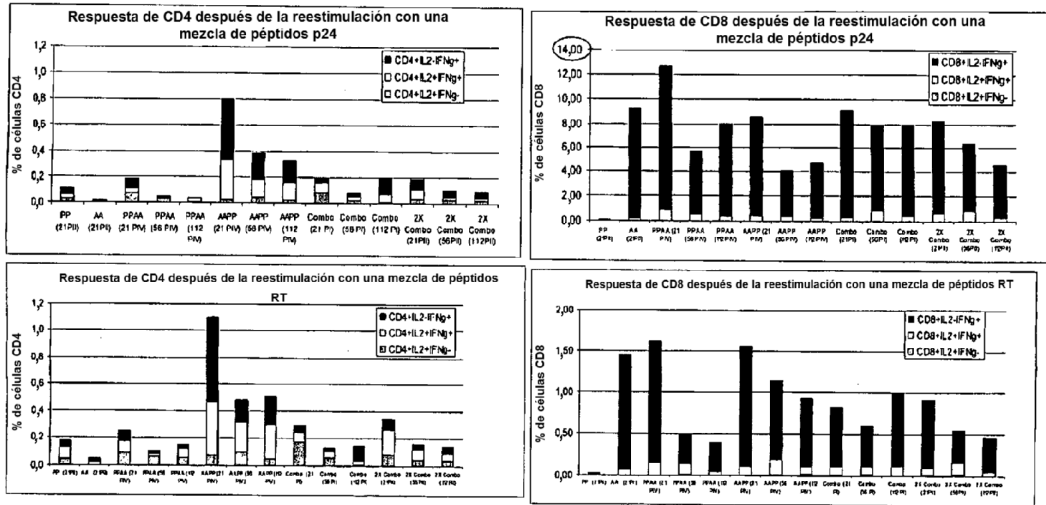


Figura 4

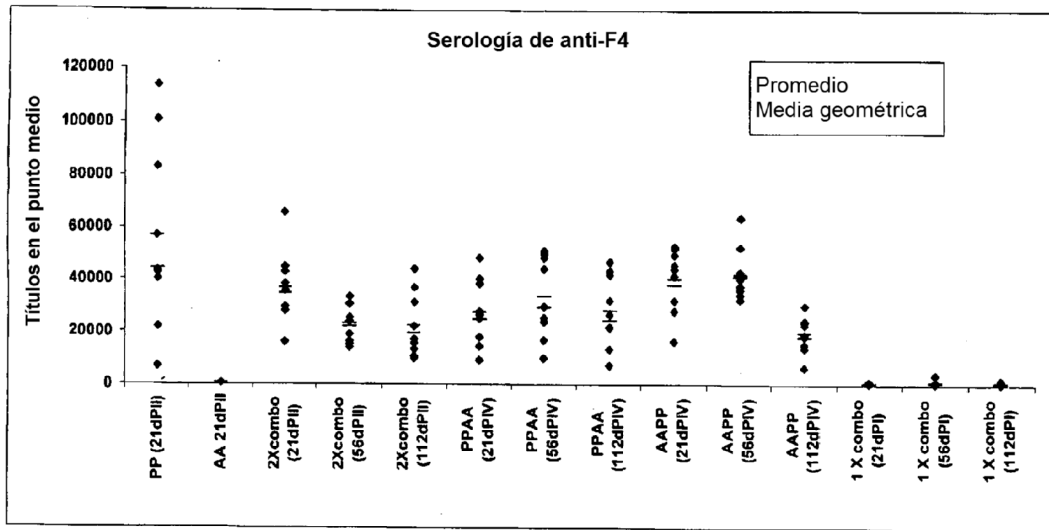


Figura 5

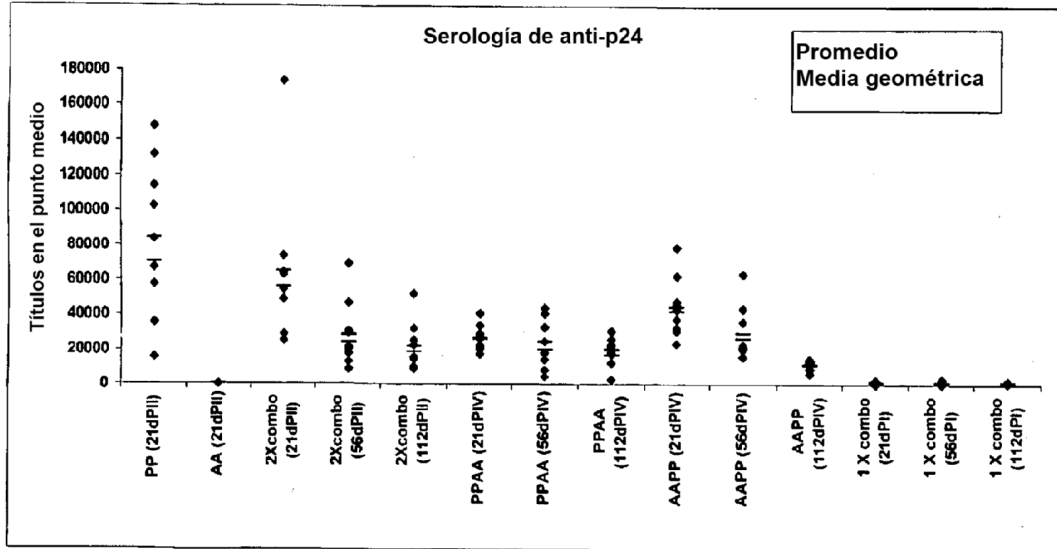


Figura 6

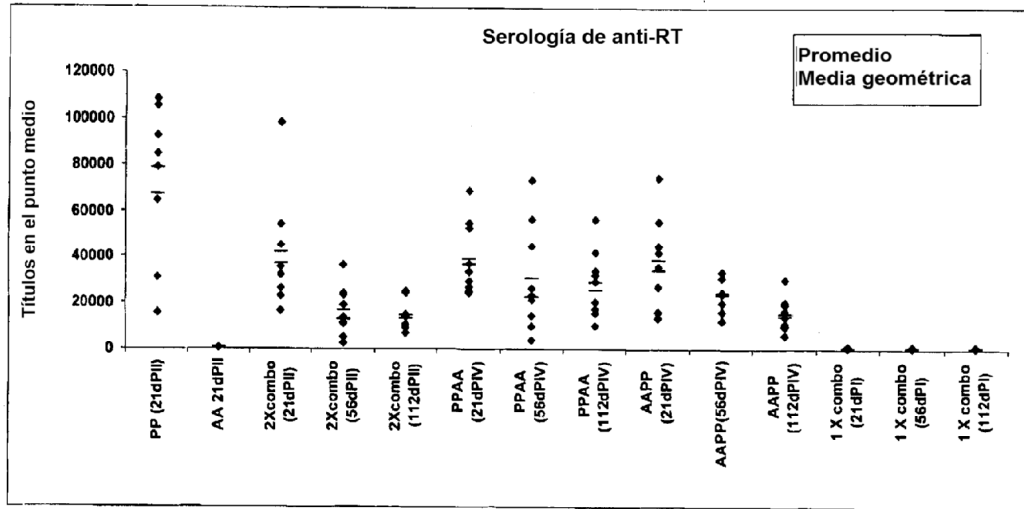


Figura 7

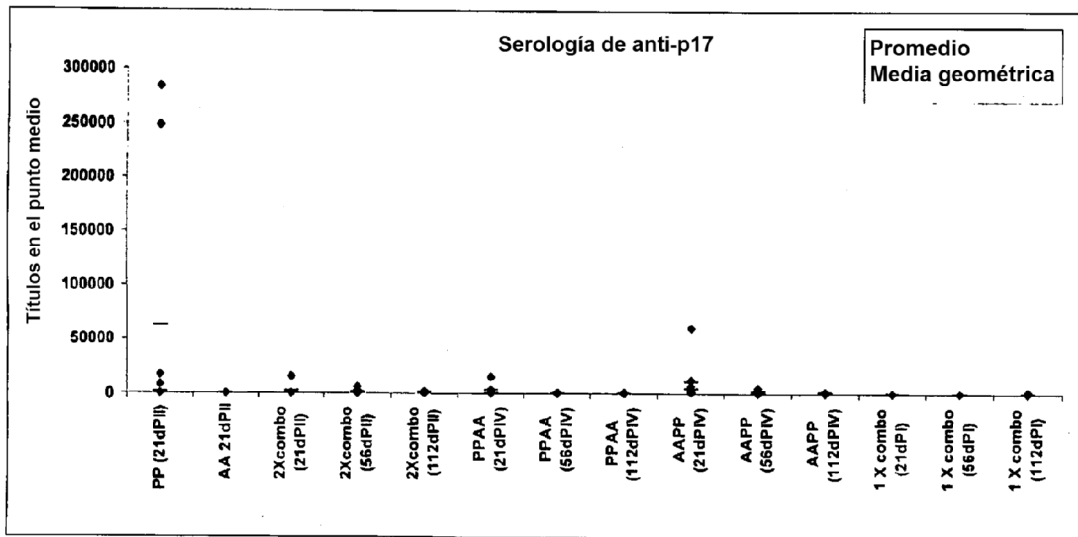


Figura 8

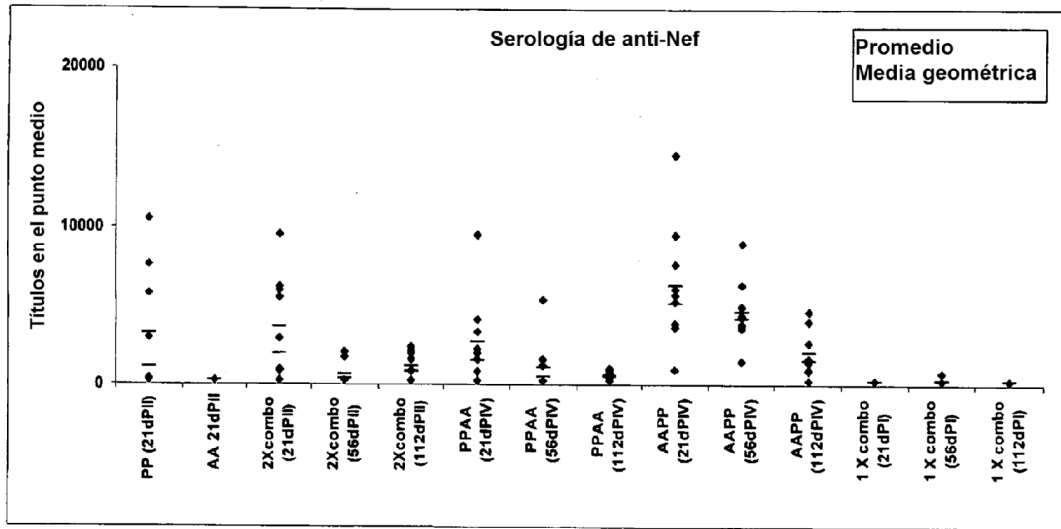


Figura 9

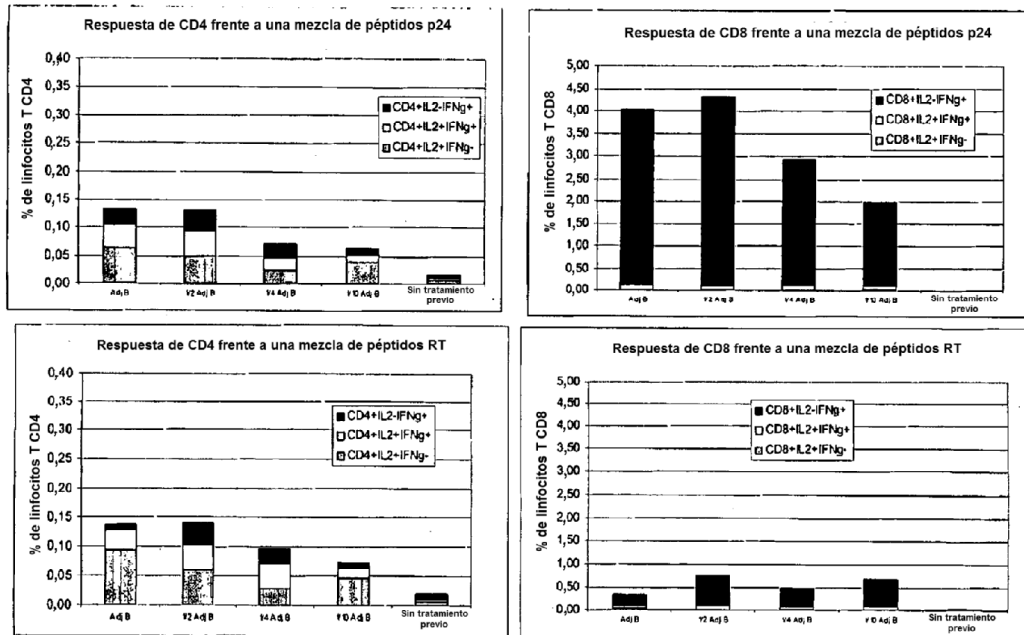


Figura 10

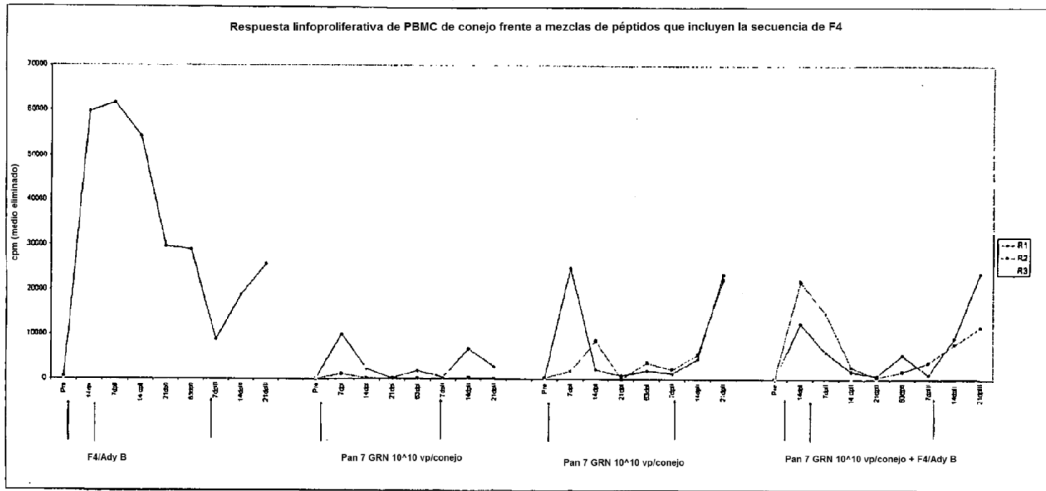


Figura 11

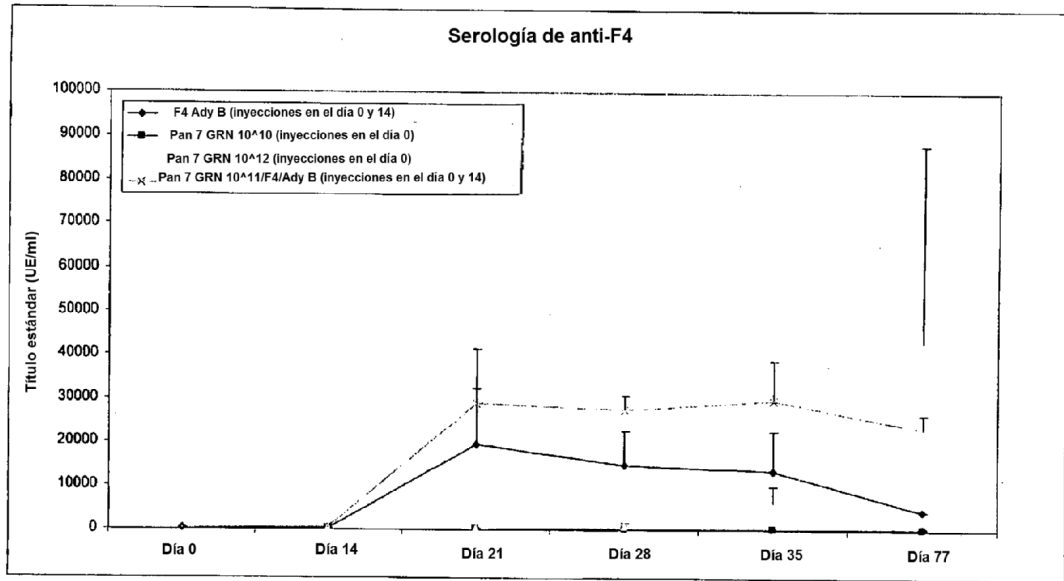


Figura 12a

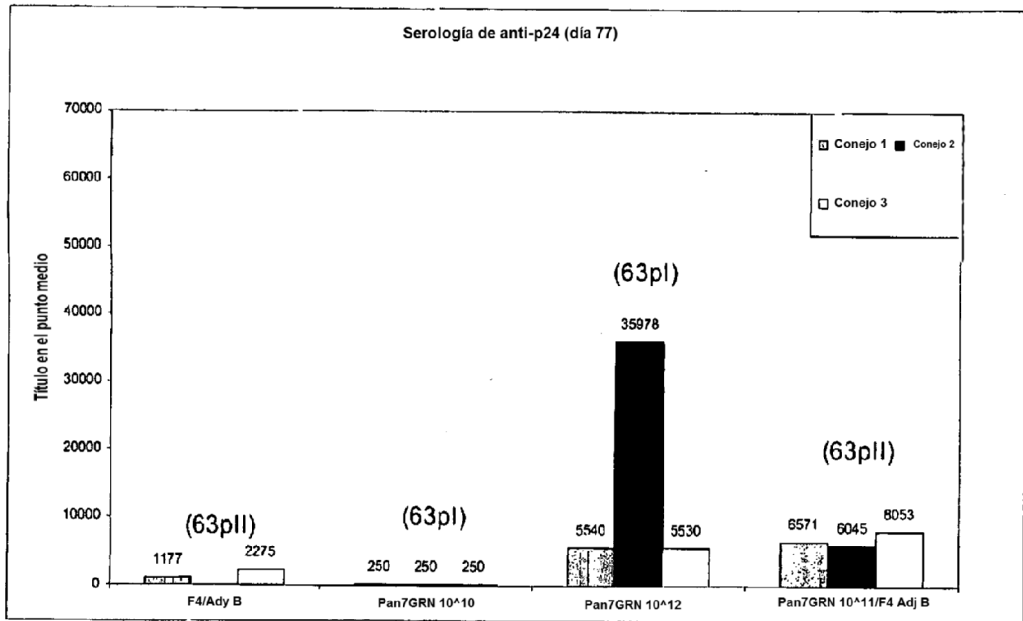


Figura 12b

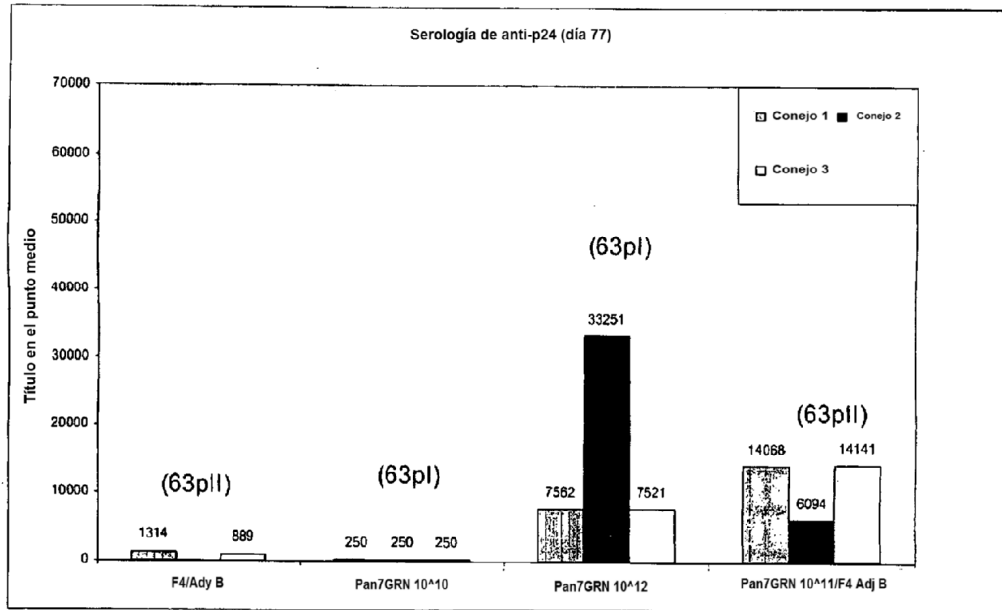


Figura 13

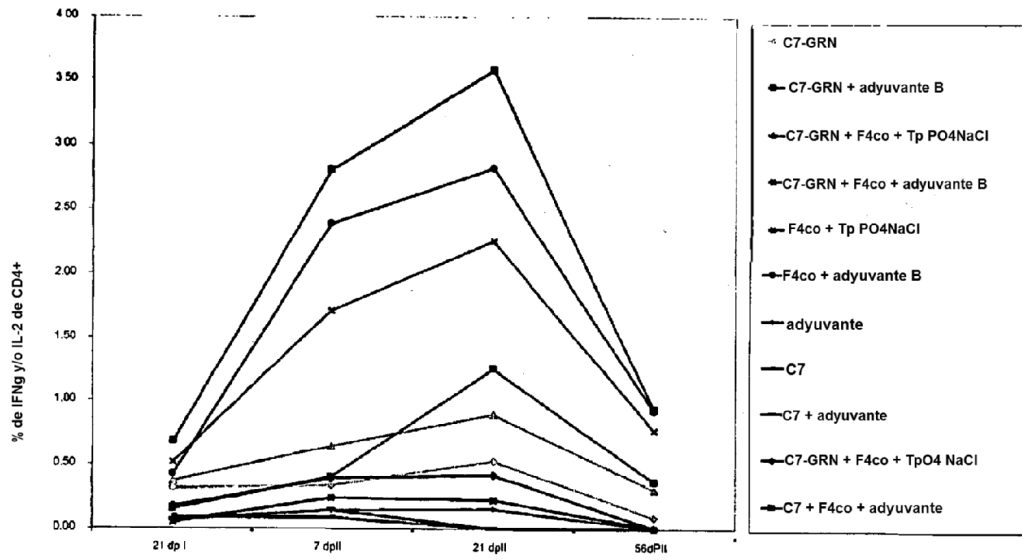


Figura 14

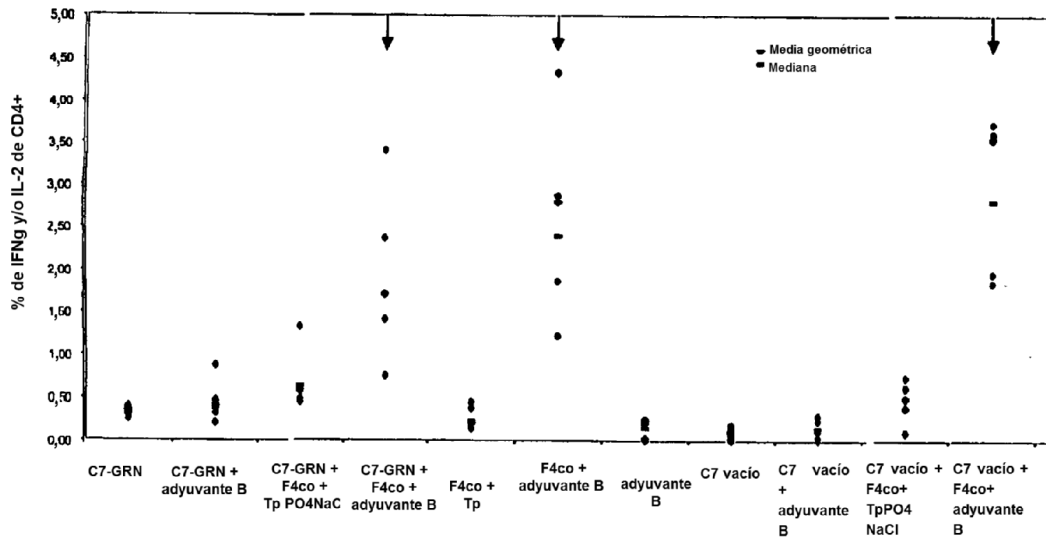


Figura 15A

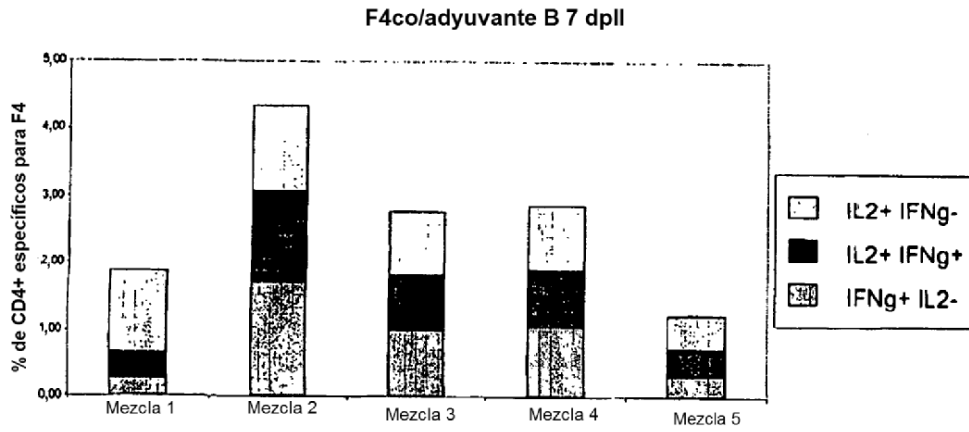


Figura 15B

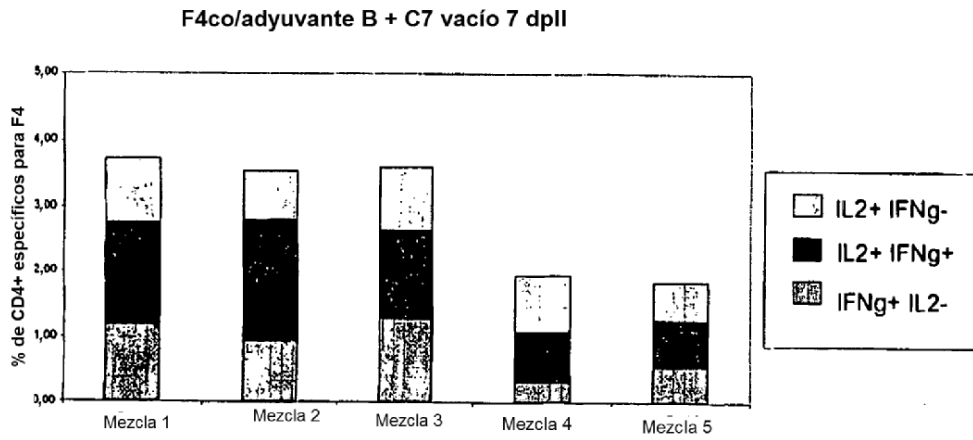


Figura 15C

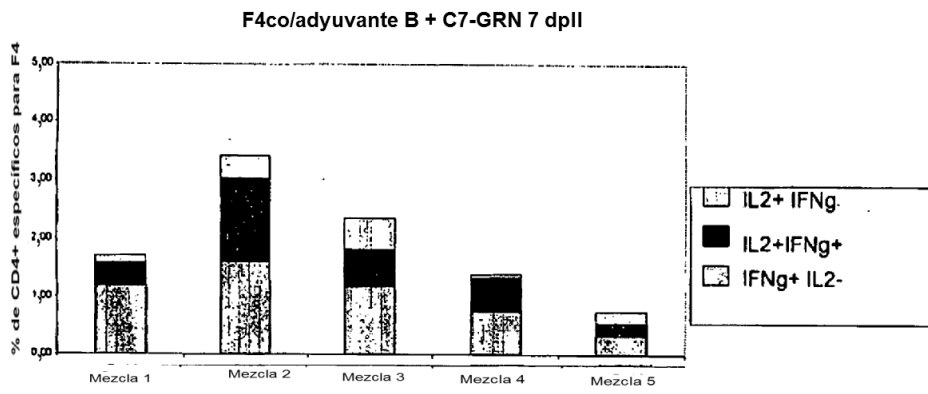


Figura 16

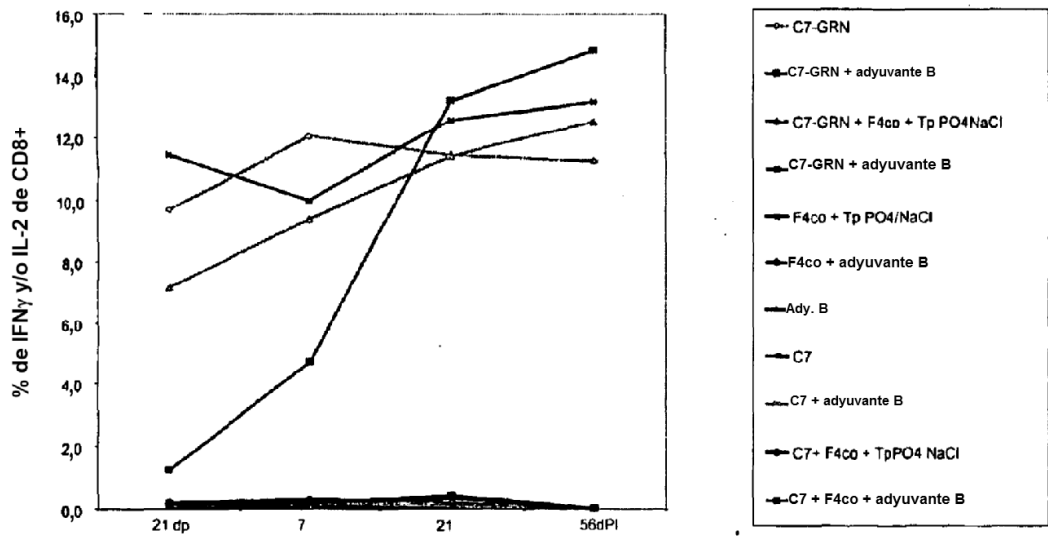


Figura 17A

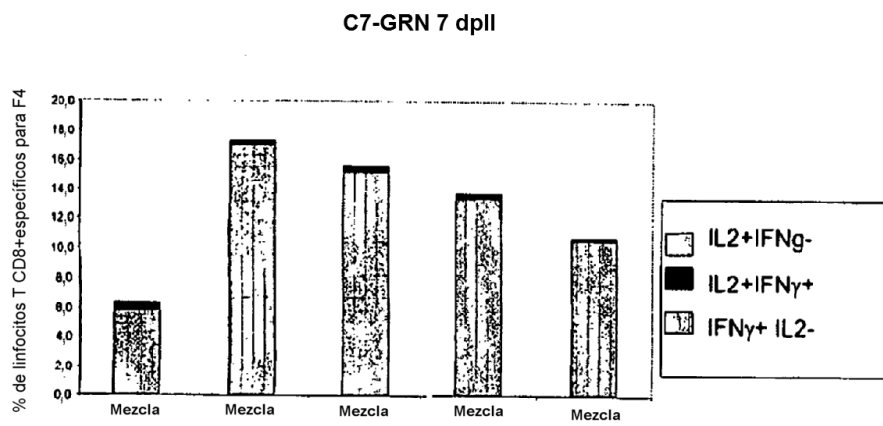


Figura 17B

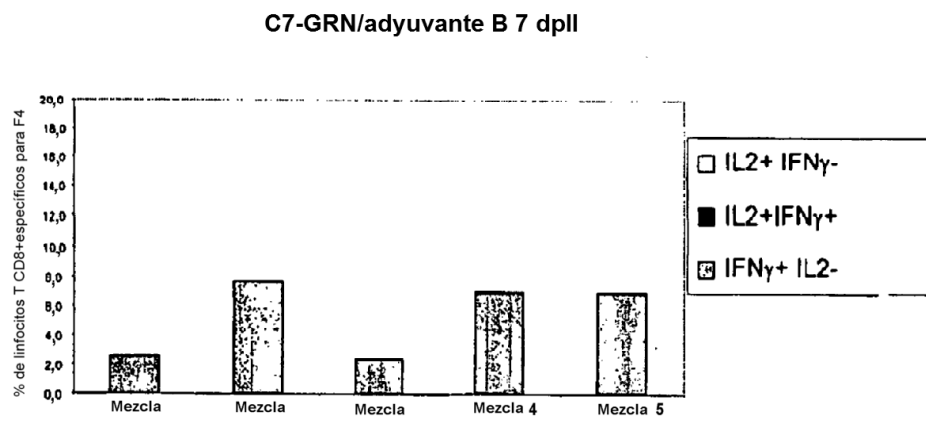


Figura 17C

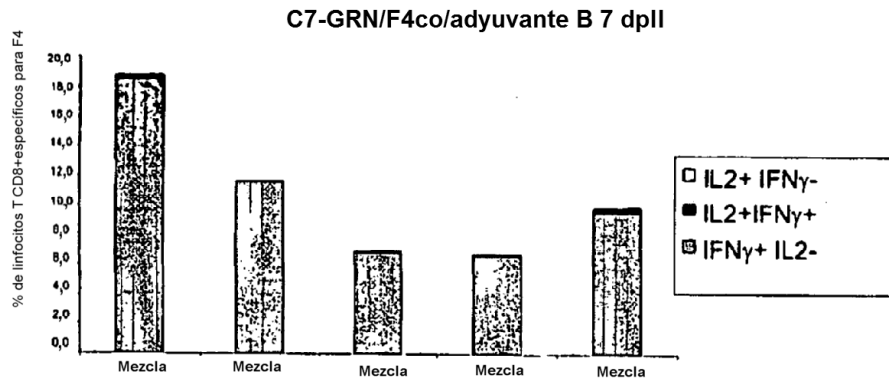


Figura 18

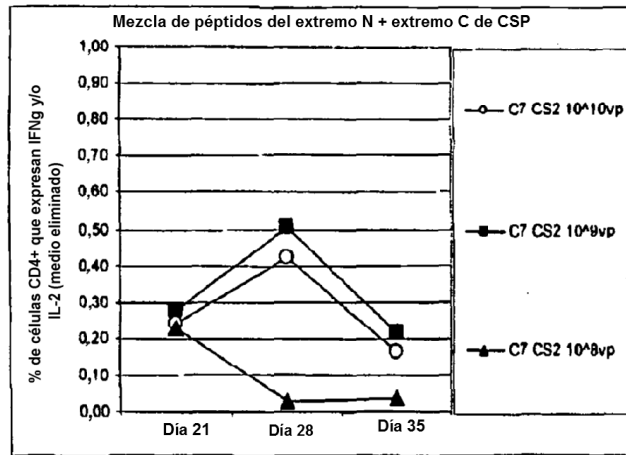


Figura 19

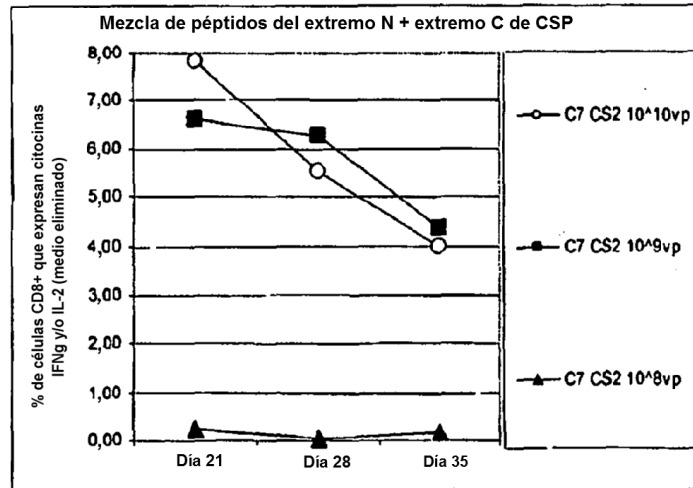


Figura 20

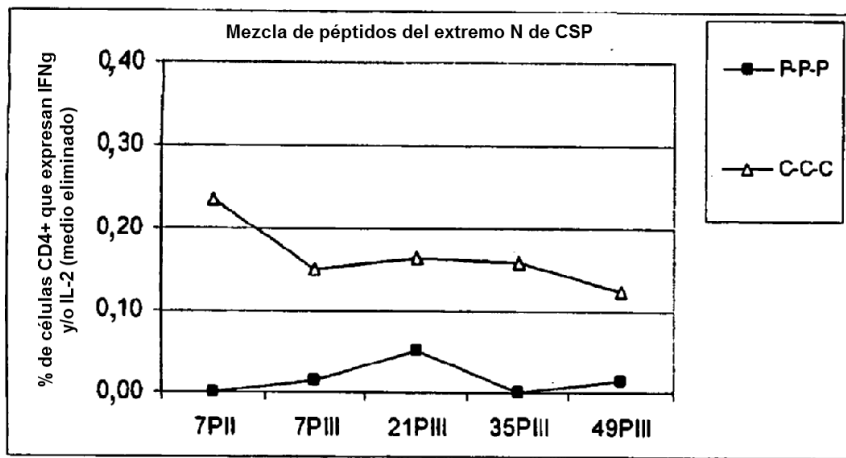


Figura 21

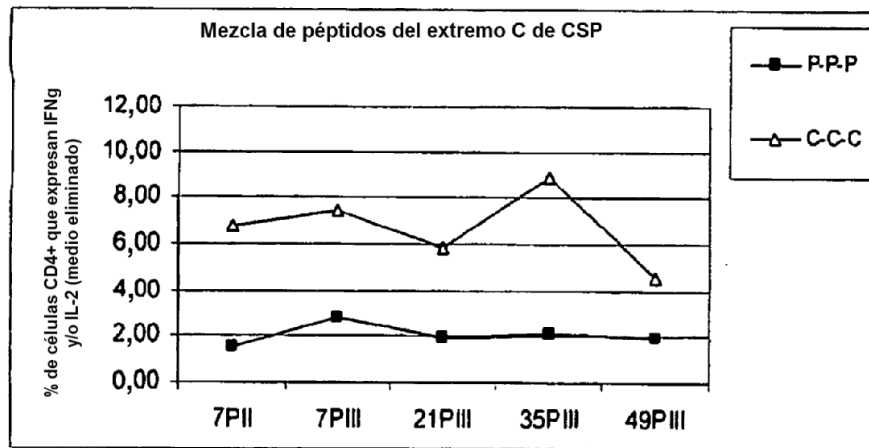


Figura 22

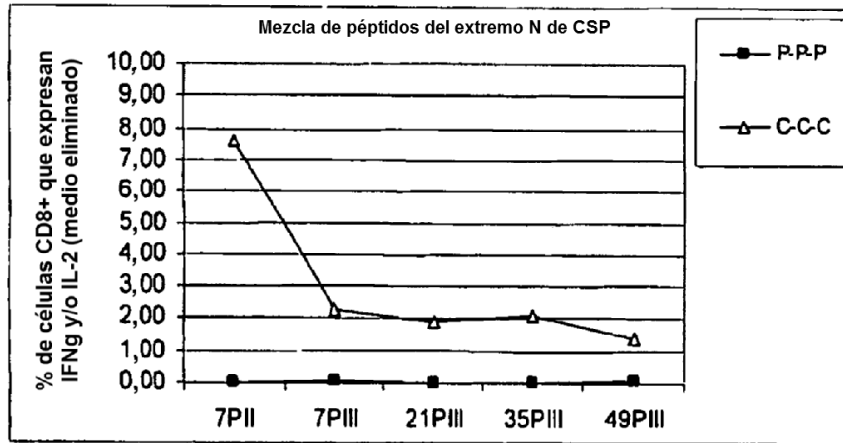


Figura 23

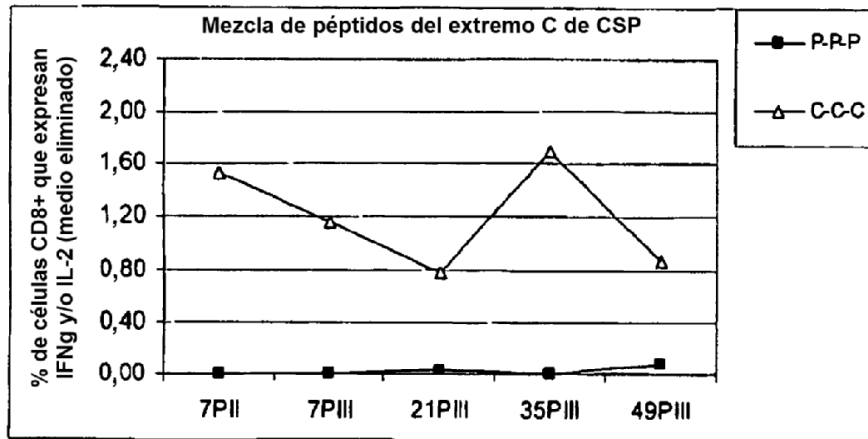


Figura 24

