



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 282 251**

51 Int. Cl.:
A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01927532 .0**

86 Fecha de presentación : **25.04.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1280551**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **05.02.2003**

54 Título: **Vacunas contra la infección por VIH.**

30 Prioridad: **27.04.2000 US 200011 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

73 Titular/es: **Sanofi Pasteur Limited**
1755 Steeles Avenue West
Toronto, Ontario M2R 3T4, CA

72 Inventor/es: **Rovinski, Benjamin;**
Tartaglia, James;
Cao, Shi-Xian;
Persson, Roy y
Klein, Michel, H.

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 282 251 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas contra la infección por VIH.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la inmunología y, en particular, a los usos de materiales para inmunizar un huésped contra la infección por VIH-1.

10 Antecedentes de la invención

El virus de inmunodeficiencia humana es un retrovirus humano y es el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Se estima que más de 33 millones de personas se han infectado por VIH en todo el mundo desde diciembre de 1999 (Ref 1- diversas referencias se ponen entre paréntesis para describir de una manera más completa el estado de la técnica a la que concierne esta invención. La información bibliográfica completa de cada cita se encuentra al final de la memoria descriptiva, inmediatamente antes de las reivindicaciones. La descripción de estas referencias se incorpora por el presente documento como referencia en la presente descripción).

Ya que la epidemia de VIH sigue extendiéndose por todo el mundo, la necesidad de una vacuna eficaz sigue siendo urgente. Se han impedido los esfuerzos para desarrollar tal vacuna por varios factores, tres de los cuales son: (a) la extraordinaria capacidad del virus para mutar; (b) la incapacidad de la mayoría de las especificidades conocidas de anticuerpos anti-VIH para neutralizar los aislados primarios de VIH constantemente; y (c) la falta de comprensión de la correlación de la inmunidad protectora con la infección por VIH. Durante los 10 últimos años se han sometido a prueba varias vacunas candidatas contra VIH en primates para determinar sus capacidades inmunoprotectoras (Ref. 2). Estos estudios sugieren que tanto los anticuerpos neutralizantes como la inmunidad mediada por células desempeñan un papel en conferir inmunidad esterilizante y prevenir la progresión hacia la enfermedad (Ref. 3 y 4). Aunque se desconocen actualmente las correlaciones de la protección inmunitaria frente a la infección por VIH-1, una vacuna eficaz contra VIH debe lograr tanto anticuerpos neutralizantes fuertes como respuestas de los linfocitos T citotóxicos (CTL, cytotoxic T lymphocyte).

Se ha demostrado que las vacunas de subunidades de la envuelta inducen respuestas humorales de títulos elevados, pero fueron ineficaces en lograr respuestas de CTL (Ref 5). Se ha demostrado que los vectores vivos de viruela recombinante logran respuestas de CTL muy potentes, sin embargo estos vectores fueron ineficaces en la generación de una respuesta de anticuerpos significativa (Ref 6). En intentos de combinar los dos tipos de inmunización, varios ensayos clínicos que implicaban una estrategia de vacuna principal, que consistía en una inmunización inicial con un vector viral seguida de refuerzos con subunidades de envuelta de VIH-1 recombinante, (Ref 7, 8), han conducido a una satisfacción limitada con respecto a las respuestas de CTL. Otros enfoques de vacunas han usado partículas similares a virus inmunogénicas, no replicantes, no infecciosas (VLP, virus-like particles) para la inmunización frente a la infección por VIH (Ref 9, 10). Este tipo de inmunógeno ha conducido a la generación de anticuerpos neutralizantes frente a una cepa de VIH-1 de laboratorio. (Ref 10).

Se ha investigado un enfoque de vacuna principal usando VLP no infecciosas para aumentar las respuestas de los CTL específicas del VIH en ratones cebados con el vector de la viruela del canario recombinante vCP205 que codifica para la gp 120 de VIH-1 (cepa MN) (Ref 11). Este estudio demostró que las VLP pueden reforzar la respuesta de los CTL al vector de la viruela del canario. Otro trabajo describe el uso de un ADN que codifica para env como un cebador de vacuna, seguido por un refuerzo con un virus vaccinia que expresa env (Ref. 11 b). Sin embargo, no se usó material procedente de aislados primarios, y no se obtuvieron niveles neutralizantes de anticuerpos.

Recientemente, se ha notificado un estudio que muestra la inducción de anticuerpos neutralizantes frente a un aislado primario de VIH-1 en chimpancés (Ref. 12). En este estudio, se usó un adenovirus recombinante que expresa gp160 como agente de cebado y se usó gp120 recombinante para reforzar a los monos.

Aún existe una necesidad de vacunas y tratamientos de inmunización para inducir tanto una respuesta fuerte de los CTL como anticuerpos neutralizantes frente a los aislados primarios de VIH.

55 Sumario de la invención

Según un aspecto de la presente invención, se proporciona una vacuna para generar, en un huésped, particularmente un huésped humano, un nivel de anticuerpos que neutraliza el virus frente a un aislado primario de VIH-1. El régimen de administración comprende al menos una administración de un antígeno de cebado al huésped, en el que el antígeno de cebado comprende una molécula de ADN que codifica para una glucoproteína de envuelta de un aislado primario de VIH-1; dejar que el huésped repose durante al menos un periodo de reposo específico para proporcionar la expansión clonal de una población de células B precursoras específicas de antígenos de VIH-1 en el mismo para proporcionar un huésped cebado; y al menos una administración de un antígeno de refuerzo al huésped cebado para proporcionar dichos niveles neutralizantes de anticuerpos, en el que el antígeno de refuerzo es un vector viral ALVAC atenuado que expresa al menos parte de una glucoproteína de envuelta de un aislado primario de VIH-1. También se describe para un fin comparativo una vacuna en la que el antígeno de refuerzo es una partícula similar a VIH inmunogénica, no replicante, no infecciosa que tiene al menos parte de la glucoproteína de envuelta de un aislado primario de VIH-1.

ES 2 282 251 T3

El aislado primario de VIH será un aislado de VIH-1 que incluye el VIH-1_{Bx08} del aislado clínico de VIH-1 del clado B, aunque puede emplearse cualquier otro aislado primario de VIH-1 en los procedimientos de inmunización de la invención.

5 La molécula de ADN que codifica para la glucoproteína de envuelta de un aislado primario de VIH-1 puede estar contenida en un vector plasmídico bajo el control de un promotor heterólogo preferiblemente un promotor de citomegalovirus, para la expresión de la glucoproteína de envuelta en el huésped, que puede ser un huésped humano.

10 Preferiblemente, el vector tiene las características identificativas de pCMV3Bx08 mostradas en la figura 2, siendo tales características identificativas los segmentos de ácido nucleico y sitios de restricción identificados en la figura 2.

15 Una administración de cebado de antígeno puede efectuarse en una administración única o en administraciones múltiples del antígeno de cebado. En el último caso, el al menos un periodo de reposo específico para permitir la expresión clonal de las células B precursoras de la población específica de antígenos de VIH puede efectuarse tras cada administración de cebado. El al menos un periodo de reposo específico puede ser de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 12 meses.

20 Cuando el antígeno de refuerzo es una partícula similar a VIH-1 inmunogénica, no replicante, no infecciosa, tal partícula puede comprender una unión de:

- (i) un producto del gen *env*,
- (ii) un producto del gen *pol*, y
- 25 (iii) un producto del gen *gag*.

30 codificándose la partícula por un genoma de VIH modificado con déficit en repeticiones terminales largas (LTR, long terminal repeats) y que contiene *gag*, *pol* y *env* en su disposición genómica natural. Tales partículas y la obtención de las mismas se describen en la patente de los EE.UU. n° 5.439.809, cedida al cesionario de la misma y cuya descripción se incorpora en el presente documento como referencia. Tales partículas pueden incluir mutaciones en *gag* y *pol* para reducir adicionalmente la infectividad potencial, tal como se describe de una manera más completa en la patente de los EE. UU. n° 6.080.408, cedida al cesionario de la misma y la descripción de la cual se incorpora en el presente documento como referencia (WO 96/06177). El gen *env* es preferiblemente el que procede del aislado primario BX08. El gen *gag* y el gen *pol* pueden ser del mismo aislado primario o pueden elegirse de otros aislados de VIH-1, que 35 pueden ser aislados primarios.

40 La partícula similar a VIH inmunogénica, no replicante, no infecciosa puede administrarse junto con un adyuvante. Puede usarse cualquier adyuvante adecuado, tales como QS21, DC-chol, RIBI o Alum. Tales partículas de VIH inmunogénicas, no replicantes, no infecciosas pueden formarse mediante la expresión a partir de un vector adecuado en células de mamífero.

45 Existe un vector descrito que comprende un genoma de VIH modificado con déficit en repeticiones terminales largas y un promotor heterólogo conectado de manera funcional a dicho genoma para la expresión de dicho genoma en células de mamífero para producir la partícula inmunogénica, no replicante y no infecciosa, en la que al menos el gen *env* del genoma de VIH modificado es el que procede de un aislado primario de VIH. Los genes *gag* y *pol* del genoma de VIH modificado pueden proceder del mismo aislado primario o de otro aislado, que puede ser un aislado primario.

50 Preferiblemente el vector es un vector plasmídico mientras que el aislado primario preferiblemente es BX08. El promotor puede ser el promotor de metalotioneína. El vector preferiblemente tiene las características identificativas del plásmido p133B1 mostrado en la figura 3, siendo tales características identificativas los segmentos de nucleótidos y los sitios de restricción identificados en la figura 3.

55 El antígeno de refuerzo de la invención es un vector viral atenuado, concretamente el virus atenuado de la viruela del canario ALVAC. El vector viral atenuado puede contener un genoma de VIH modificado con déficit en repeticiones terminales largas (LTR), en el que al menos el gen *env* es el procedente del aislado primario BX08. Los genes *gag* y *pol* del genoma modificado pueden ser los procedentes del mismo aislado primario o pueden elegirse a partir de otro aislado de VIH.

60 El vector basado en el virus de la viruela del canario atenuado ALVAC es un derivado clonado en placa de la vacuna de la viruela del canario autorizada, Kanapox, y se describe en la referencia 19. El vector de la viruela del canario atenuado preferiblemente tiene las características identificativas de vCP1579 mostrado en la figura 4, siendo tales características identificativas los segmentos de ácido nucleico y los sitios de restricción identificados en la figura 4.

65 La al menos una administración de un antígeno de refuerzo puede efectuarse en una única administración o al menos dos administraciones del antígeno de refuerzo.

ES 2 282 251 T3

La invención incluye además composiciones que comprenden los inmunógenos tal como se proporcionan en el presente documento y su uso en la fabricación y formulación de composiciones inmunogénicas incluyendo vacunas.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La presente invención se entenderá mejor a partir de la siguiente descripción en referencia a los dibujos, en los que:
la figura 1 muestra los detalles de los elementos del plásmido pCMVgDtat vpr Bx08.
- 10 La figura 2 muestra los detalles de los elementos del plásmido pCMV3Bx08.
La figura 3 muestra los detalles de los elementos del plásmido p133B1.
La figura 4 muestra los detalles de las inserciones en ALVAC (2) para proporcionar el vector vCP1579.
- 15 Las figuras 5A y 5B contienen una representación en forma de línea temporal del régimen de inmunización usado en el que los grupos de estudio se describen en la tabla 1. Los números bajo las líneas se refieren a semanas.
La figura 6 muestra la inmunorreactividad frente a los antígenos de VIH-1 antígenos del suero diluidos 1:100 de los macacos inmunizados con las diversas preparaciones tal como se describe en la tabla 1.
- 20 La figura 7 muestra la inmunorreactividad frente a los antígenos de VIH-1 del suero diluido 1:1000 de los macacos inmunizados con las diversas preparaciones tal como se describe en la tabla 1.
La figura 8 muestra los detalles de los elementos de pMPC6H6K3E3.
La figura 9 muestra los detalles de los elementos de pMPC5H6PN.
La figura 10 muestra los detalles de los elementos de pHIV76.
- 30 La figura 11 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) para el casete del epítipo H6/VIH Pol/Nef en el sitio C5 de ALVAC de vCP1579.
La figura 12 contiene la secuencia de nucleótidos de la región C6 (hebra codificante SEQ ID NO: 16, hebra complementaria SEQ ID NO: 17, secuencia de aminoácidos K3L SEQ ID NO: 18, secuencia de aminoácidos E3L SEQ ID NO: 19).

Descripción general de la invención

- 40 Tal como se ha señalado anteriormente, la presente invención implica la administración de antígenos de VIH para lograr niveles de anticuerpos que neutralizan el virus frente a un aislado primario de VIH.
Se preparó un constructo de ADN que incorporaba el gen *env* del aislado primario Bx08 bajo el control del promotor de citomegalovirus y se muestra el constructo, pCMV3Bx08, en la figura 2. El constructo pCMV3Bx08 se deriva a partir del plásmido pCMVgDtat vpr Bx08 que se observa en la figura 1. Se usó el constructo de ADN pCMV3Bx08 en una etapa de inmunización de cebado en un huésped, siendo los monos macaco el modelo animal elegido.
- 50 Tras la etapa de inmunización de cebado, que puede efectuarse en una o más administraciones del constructo de ADN, se permite reposar al huésped para proporcionar la expresión clonal de una población específica de antígenos de VIH de células B precursoras proporcionando de este modo un huésped cebado.
La administración de refuerzo se efectúa o bien con una partícula similar a VIH inmunogénica, no replicante, no infecciosa (VLP) (con fines comparativos) o un vector viral atenuado (según la invención).
- 55 Para este fin, se construyó un plásmido de expresión de VLP que contenía un genoma de VIH modificado al que le faltaban repeticiones terminales largas en el que el gen *env* se deriva a partir del aislado primario BX08, en el que el genoma de VIH modificado está bajo el control de un promotor de metalotioneína. El constructo, p133B1, mostrado en la figura 3, se usó para efectuar la expresión de partículas similares a VIH inmunogénicas, no replicantes, no infecciosas en células de mamífero en las que el producto del gen *env*, es el procedente del aislado primario BX08.
- 60 En el caso del vector viral atenuado, se construyó un vector viral de la viruela del canario atenuado recombinante para contener el gen *env* del aislado primario BX08. El vector viral vCP1579 (figura 4) se preparó mediante una variedad de manipulaciones del plásmido pHIV76 (figura 10), tal como se muestra descrito en detalle a continuación.
- 65 Estos productos se utilizaron en una administración de refuerzo a los macacos cebados. La administración de refuerzo puede efectuarse en una o más inmunizaciones. En un aspecto preferido de la invención las partículas similares a VIH inmunogénicas, no replicantes, no infecciosas pueden administrarse conjuntamente con el constructo de ADN

ES 2 282 251 T3

en la administración de cebado y el constructo de ADN puede administrarse conjuntamente con las partículas similares a virus en la administración de refuerzo.

5 Las inmunizaciones se efectuaron según el procedimiento descrito en el presente documento y los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos usando otros protocolos según los protocolos expuestos en la tabla 1. Los regímenes de administración usados se muestran como líneas temporales en las figuras 5A y 5B.

10 Los resultados obtenidos siguiendo los diversos protocolos mostraron que, en particular, una vacunación con ADN primaria en combinación con un refuerzo de o bien la VLP o el virus de la viruela del canario atenuado aumentaba los niveles de anticuerpos neutralizantes, tal como se indica mediante la reducción detectable en los niveles de p24 en las células infectadas con aislados de VIH primarios.

Depósitos biológicos

15 Algunos vectores que se describen y a los que se hace referencia en el presente documento se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, American Type Culture Collection), ubicada en 10801 University Boulevard Manassas, Virginia 20110-2209, EE.UU., conforme al Tratado de Budapest y anteriormente a la presentación de esta solicitud. Las muestras de los vectores depositados estarán disponibles para el público y todas las restricciones impuestas sobre el acceso a los depósitos de eliminarán tras la concesión de una patente basada en esta solicitud de
20 patente. Además, se sustituirá el depósito si no pueden dispensarse muestras viable por el depositario. La invención descrita y reivindicada en el presente documento no está limitada en alcance por los materiales biológicos depositados ya que la realización depositada está concebida sólo como una ilustración de la invención. Cualquier vector equivalente o similar que contenga ácidos nucleicos que codifiquen para antígenos equivalentes o similares tal como se describieron en esta solicitud está dentro del alcance de la invención.

25

	<u>Sumario de depósito</u>		
	<u>Plásmido</u>	<u>ATCC</u>	<u>Fecha de depósito</u>
30	pMT-VIH	40912	12 de octubre de 1990
	pCMVgDtat vpr	209446	11 de noviembre de 1997

Ejemplos

35 La descripción anterior describe de forma general la presente invención. Puede obtenerse una comprensión más completa en referencia a los ejemplos específicos siguientes. Estos ejemplos se describen únicamente con fines de ilustración y no están concebidos para limitar el alcance de la invención. Se contemplan cambios obvios en la forma y la sustitución de equivalentes según lo puedan sugerir o hacer conveniente las circunstancias.

40 Ejemplo 1

Este ejemplo describe la construcción del plásmido pCMV3BX08.

45 El plásmido, pCMV3BX08, contiene segmentos de secuencia de diversas fuentes y los elementos de construcción se representan en la figura 2.

50 El vector procariota pBluescript SK (Stratagene) es la estructura principal del plásmido pCMV3.BX08 y se modificó mediante la sustitución del gen *Amp^R* con *Kan^R* y la delección de la región de fl y de LacZ. Para lograr las modificaciones deseadas, se delecionó la secuencia entre *AhdI* (nucleótido 2.041) y *SacI* (nucleótido 759) de pBluescript SK, que contiene el *Amp^R*, el origen de fl y el LacZ. Un fragmento de *PstI* de 1,2 kb del plásmido pUC-4k (Pharmacia) que contiene el gen *Kan^R*, se ligó por extremos romos al sitio *AhdI* de de pBluescript SK en una orientación en sentido contrario de las agujas del reloj en relación con su transcripción. Se ligó un fragmento de ADN de *SspI/PstI* de 1,6 kb que contiene las secuencias del promotor de los genes inmediatos-tempranos del citomegalovirus humano, del potenciador y del intrón A (CMV) al otro extremo del gen *Kan^R* de manera que la transcripción a partir
55 del promotor de CMV se produce en la orientación del sentido de las agujas del reloj. Se usó un segmento de oligonucleótidos sintético que contenía la secuencia de iniciación de la traducción y las secuencias que codifican para el péptido señal activador del plasminógeno de tejido humano (TPA, tissue plasminogen activator) para ligar el promotor de CMV y las secuencias que codifican para el gen de la envuelta del aislado primario VIH-1_{BX08}.

60 Se aisló el gen de la envuelta del aislado primario de VIH-1 BX08 del plásmido pCMVgDtat vpr Bx08 ilustrado en la figura 1. Se derivó el plásmido pCMVgDtat vpr Bx08 a partir del plásmido depositado pCMVgDtat vpr, la construcción del cual se describe en la solicitud de patente en tramitación junto con la presente de los EE.UU. n° 08/991.773 presentada el 16 de diciembre de 1997, cedida al cesionario del presente documento y la descripción de la cual se incorpora al presente documento como referencia, (WO 99/31250). Se derivó el plásmido pCMVgDtat vpr Bx08 mediante la sustitución de la secuencia de la envuelta de BX08 del aislado clínico de VIH-1_{BX08} del clado B por la secuencia de genoma de VIH modificado presente en el pCMVgDtat vpr. Se restringió el plásmido pCMVgDtat vpr Bx08 con la enzima de restricción *Xho I* y se hicieron romos sus extremos con tratamiento con Klenow. Después

ES 2 282 251 T3

se llevó a cabo una digestión parcial con *Not I* y se aisló el fragmento resultante de 6,3 kb que contenía el gen env. Se restringió el plásmido pCMV3 (Invitrogen) con *Bam HI* y se hicieron romos sus extremos con tratamiento con Klenow. Después se restringió el plásmido pCMV3 con *Not I* y se aisló el fragmento resultante de 4,4 kb. Se ligaron juntos los fragmentos de 6,3 y 4,4 kb para producir el plásmido pCMV3BX08 (figura 2).

Se introdujo el constructo pCMV3BX08 en células competentes HB101 según las recomendaciones del fabricante (GibcoBRL). Se identificaron los clones moleculares correctos mediante análisis de restricción y secuenciación y se examinó su expresión de la glucoproteína de envuelta en transfecciones transitorias seguidas de análisis de transferencia de tipo Western.

Todos los ADN usados para las inmunizaciones se prepararon usando el kit EndoFree Plasmid (Qiagen). Se inyectaron o bien 3 mg o bien 600 μ g de pCMVBX08, en 100 ml de PBS para las inmunizaciones intramusculares.

El ADN proviral del aislado clínico VIH-1_{BX08} del VIH-1 del clado B se originó en Transgene (Estrasburgo, Francia) y se aisló del ADN genómico de células infectadas con el virus.

Ejemplo 2

Este ejemplo describe la construcción del plásmido p133B1.

Se modificó mediante ingeniería genética un vector de expresión de plásmido Bx08 (p133B1, figura 3) usado para transfectar las células de mamíferos en diferentes estadios usando pUC18 como plásmido inicial huésped. En primer lugar se aisló un fragmento de 8,3 kpb del provirus VIH-1_{LAI} que codifica para las proteínas gag, pol y env. A este fragmento le faltaban los elementos reguladores de la transcripción y los elementos de repetición terminales largos de cada extremo del genoma proviral para garantizar que las partículas similares a virus fueran incompetentes para la replicación. Se ligó este fragmento a un promotor de metalotioneína de tipo IIA (MTIIA) humano inducible (Ref. 13) y también a una secuencia de terminación de transcripción/adición de poliadenilación (poliA) del virus de simio 40 (SV40) del plásmido pSV2dhfr (Ref 14). Después se insertó el fragmento modificado en el vector huésped pUC18. Se usó el constructo de expresión depositado resultante, denominado pMT-VIH, para transfectar células COS de riñón de mono y células de riñón de mono verde africano (Vero). El procedimiento para obtener el pMT-HIV se describe adicionalmente en la patente de los EE.UU. n° 5.439.809 mencionada anteriormente. Ambas líneas celulares transfectadas produjeron partículas similares a virus no replicantes cuando se inducían con iones de metal (Ref 15).

Se hicieron dos modificaciones adicionales al ADN proviral en el pMT-HIV para proporcionar características de seguridad adicionales para proteger a las células humanas frente a los eventos de recombinación con el ADN retrotranscrito

1) inactivación de las secuencias empaquetadoras de ARN; y

2) delección de una sección grande del gen *pol* que codifica para la integrasa y la transcriptasa inversa.

Para deleccionar la primera señal de empaquetamiento de ARN, se sustituyó parte del ADN correspondiente a la secuencia líder sin traducir del ARNm con un ADN sintético al que le faltaba un motivo de 25 pb correspondiente a los nucleótidos 753-777 (la secuencia *psi*). Para inactivar la segunda señal de empaquetamiento de ARN se cambiaron dos residuos de adenosina de una secuencia dedo de zinc del gen *gag* por dos residuos de timidina. Cada una de estas sustituciones tuvo el efecto de sustituir residuos de cisteína en una serie de Cys-His por una serina en el producto del gen.

La delección del gen *pol* se efectuó mediante la sustitución de un fragmento de 1,9 kpb con un ADN sintético que contenía codones de parada en los tres marcos de lectura. Esto evitó la traducción ultralectura de la secuencia codificante de la integrasa residual en el lado 3' de la delección. La delección de 1,9 kpb en *pol* también eliminó la expresión de las enzimas integrasa y transcriptasa inversa. Sin embargo, la delección dejó intacto el gen que codifica para la proteasa viral, que es tanto un componente inmunogénico de las partículas virales de VIH-1 como permite la expresión de partículas con antígenos gag procesados que se parecen mucho a los viriones nativos (Ref 16). La proteasa también contiene epítomos que se conservan en todos los clados de VIH-1. Las modificaciones descritas con respecto a los genes *gag* y *pol* se describen de una manera más completa en la patente de los EE.UU. n° 6.080.408 mencionada anteriormente (WO 96/06177).

Finalmente, el gen *env* de VIH-1_{LAI} que se encontraba en pMT-HIV se sustituyó con el de VIH-1_{BX08}. Para efectuar esta sustitución, se amplificó un fragmento de 2440 pb que contenía el gen env de Bx08 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de células aisladas con este aislado. Después se usó el producto de la PCR para sustituir la región correspondiente presente en pMT-HIV. Sin embargo, el fragmento insertado de VIH-1_{BX08} era 125 pb más corto que la región original VIH_{LAI} debido a una delección en la región sin traducir entre el codón de parada del gen env y la secuencia de terminación/adición de poliA. El constructo resultante sustituyó todo excepto once residuos de aminoácidos de las proteínas gp120 y gp41 de la envuelta de LAI. De estos once, sólo los primeros tres difieren entre los aislados LAI y Bx08, y estos son todos cambios conservadores de carga, lo que significa que el vector de expresión final (p133B1) codificaba para una proteína env de VIH-1_{BX08} casi auténtica.

ES 2 282 251 T3

Ejemplo 3

Este ejemplo describe la producción de partículas similares a VIH-1 con fines comparativos.

5 Se recogieron células de riñón de mono verde africano (Vero) y se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene suero fetal bovino (SFB) al 10% v/v, denominado en adelante medio completo. En el pase 141, se transfectaron las células con p133B1 usando el método del fosfato de calcio cuando alcanzaron aproximadamente el 30% de confluencia. Se sometieron las células a choque con glicerol 8 horas tras la transfección. Para esta etapa se prepararon seis placas de 10 cm que contenían aproximadamente $3,0 \times 10^6$ células cada una en 10,0 ml de medio completo. Cada placa recibió 25,0 μg de vector de expresión y 2,0 μg de plásmido pSV2neo (Ref 17). El pSV2neo contiene un gen marcador seleccionable que le confiere resistencia al antibiótico genético (G418). Dos días después de la transfección, se recogieron las células de cada placa mediante tripsinización y se las sembró en veinticinco placas nuevas en medio completo complementado con 0,5 mg/ml de G418.

15 En total, se aislaron 394 colonias de las placas usando cilindros de clonación. Cada colonia se recogió mediante tripsinización y se dividió en dos pocillos de una placa de serocultivo, uno de los pocillos por clon se indujo tras alcanzar del 50% al 90% de confluencia. Antes de la inducción, se trataron los pocillos mediante sustitución de todo el medio con medio completo nuevo que contenía 5-azacitidina 10 μM . Tras incubar durante entre 18 horas y 22 horas, se eliminó el medio y se sustituyó con DMEM nuevo que contenía SFB al 0,2% v/v, CdCl_2 2,0 μM y ZnCl_2 200,0 μM . Se incubaron los pocillos durante de 20 horas a 24 horas adicionales tiempo en el cual se eliminaron las muestras del medio y se sometieron a la prueba de ELISA en p24.

20 Se eligieron los veinte clones que más producían, basándose en el título de la p24, y se subcultivaron las células de los pocillos sin inducir correspondientes en un frasco T-25 y uno T-150 por clon. Se cultivaron ambos frascos hasta la confluencia. Se recogieron las células del T-150 mediante tripsinización y se conservaron en frío en el pase número 145. Se recogieron las células del T-25 mediante tripsinización cada de 3 días a 4 días y se mantuvieron hasta el pase 153. Se indujeron las células tal como anteriormente y volvieron a someterse las muestras a la prueba de ELISA en p24 en dos pases diferentes antes del pase 153.

30 Se seleccionaron los dos mayores productores y se recogieron mediante tripsinización cada de 3 días a 4 días hasta el pase 163. Se sometieron las muestras de los clones a la prueba de ELISA en gp120 y p24 desde el pase 158 y a ELISA en p24 en el pase 163, para evaluar la estabilidad clonal. Se eligió la más adecuada de estas dos líneas celulares, denominada 148 a 391, para una subclonación adicional. La nomenclatura del clon define el número del experimento de este procedimiento, que fue el 148, y el número del clon que fue el número 391 de los 394 aislados originales.

35 Se cultivaron las células vero durante aproximadamente de 100 h a 103 h y después se cambió el medio con medio de crecimiento que contenía 5-azacitidina. Después se incubaron las botellas durante de 20 h a 22 h adicionales, tiempo en el que el medio se sustituyó por medio sin suero que contenía CdCl_2 y ZnCl_2 . Después se incubaron las botellas durante de 29 h a 31 h, tiempo en el que se recogió, reunió y almacenó el medio a de 2°C a 8°C antes de la purificación.

40 El día siguiente después de la recogida, se aclaró, concentró y diafiltró la solución con tampón fosfato. Se pasó el concentrado a través de una columna de hidroxiapatito (tipo I) cerámica y se recogió la fracción no retenida. Se reunió la fracción no retenida de dos sublotes y se bombeó sobre un gradiente de densidad de sacarosa en un rotor de ultracentrífuga zonal continua. Se recogieron y reunieron las fracciones que contenían pseudoviriones. Se diafiltraron las fracciones de los pseudoviriones con PBS que contenía un 2,5% de sacarosa para reducir el contenido de sacarosa, se concentró y se diafiltró de nuevo. Se filtró en condiciones estériles el material usando un filtro de 0,2 mm. En este estadio los materiales se designaron como un sublote purificado y se almacenaron a de 2 a 8°C.

50 Se prepararon los adyuvantes por separado y se esterizaron por filtro antes de rellenar los viales de dosis única. El QS21 se almacenó a -20°C.

Ejemplo 4

Este ejemplo describe la producción del virus de la viruela recombinante vCP1579.

55 El virus de la viruela recombinante vCP1579 (figura 4) contiene los genes de la proteasa y gag de VIH-1 derivados del aislado VIH-1 IIIB aislado, las secuencias de la envuelta de gp120 derivadas del aislado VIH-1 Bx08, y secuencias que codifican para un polipéptido que abarca los epítomos de CTL humanos conocidos de VIH-1 Nef y Pol.

60 Se generó el vCP1579 recombinante (figura 4) mediante la inserción de las secuencias modificantes del vector de pMPC6H6K3E3 (figura 8) que codifican para E3L y K3L en el sitio C6 del vCP1566 recombinante (figura 4). Se generó el vCP1566 recombinante mediante la inserción de un casete de expresión que codifica para un polipéptido sintético que contiene epítomos Pol CTL y epítomos Nef CTL (figura 11) y el plásmido pMPC5H6PN (figura 9) en el vCP1453 en el sitio de inserción conocido como C5. Se generó el vCP1453 recombinante mediante inserción conjunta de genes que codifican para los productos génicos de env y gag/proteasa de VIH-1, el plásmido pHIV76 (figura 10), en el genoma de ALVAC en el sitio de inserción conocido como C3.

ES 2 282 251 T3

La construcción de vectores de viruela recombinantes que contienen los genes E3L y K3L se ha descrito en la patente de los EE.UU. n° 6.004.777 expedida el 21 de diciembre de 1999 a Tartaglia *et al.* y los vectores de viruela recombinantes que describen la inserción de genes de VIH se ha descrito en la patente de los EE.UU. n° 5.766.598, expedida el 16 de junio de 1998 a Paoletti *et al.*

Se usó el locus denominado C3 para la inserción de las secuencias de los genes *env* y *gag* en el vector ALVAC (2), y el locus denominado C5 fue el sitio de inserción para las secuencias que codifican para los epítomos de CTL de Nef y Pol de VIH-1. En virtud de los loci C3 y C5 que existen dentro de las repeticiones terminales invertidas (ITR, inverted terminal repetitions) extensas del genoma del virus (aproximadamente 41 kpb), la inserción en estos loci da como resultado la producción de dos copias de las secuencias de VIH-1 insertadas.

Brevemente, se modificó mediante ingeniería genética el casete de expresión pHIV76 (figura 10) de la siguiente manera. Se usó el plásmido p133B1 (figura 3) que contiene el gen gp160 de VIH-Bx08 como plásmido inicial. Se clonó el extremo 3' del promotor H6 en el sentido de 5' del gen gp160 y se modificaron tres secuencias señal de terminación de la transcripción temprana (T₅NT) del virus de la viruela. Esto se consiguió mediante la clonación de un fragmento de PCR digerido con *Bam*HI de 2.600 pb, que contenía el extremo 3' del promotor H6 y el gen gp160 del VIH-1 (BX08) modificado por T₅NT, en el sitio de *Bam*HI de pBS-SK. Se generó este fragmento de PCR a partir de cuatro fragmentos de PCR solapantes (un fragmento de 570 pb, un fragmento de 140 pb, un fragmento de 500 pb y un fragmento de 1.450 pb) y los oligonucleótidos, RW835 (5'-ATCATCATCGGATCCCGGGGTCGC GATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATGAAAGTGAAGGAC C-3'-SEQ ID NO: 2) y RW836 (5'-ATCATCATCG GATCCCGGGGTT ATAGCAAAGCCCTTTC-3' - SEQ ID NO: 3). El fragmento de PCR de 570 pb, que contenía el extremo 3' del promotor H6 y el extremo 5' del gen gp160, se generó a partir del plásmido, p133B1, con los oligonucleótidos, RW835 (5'-ATCATCATCGGATCCCGGGGTCGCGATATCCGTTAAGTTTGTATCGTAATG AAAGTGAAGGAGAC-3') y RW868 (5'-ATCAAGACTATAGAAGA GTGCATATTCTCTTTCATC-3'). El fragmento de PCR de 140 pb, que contenía una porción interior del gen gp160, se generó a partir del plásmido p133-B1 con los oligonucleótidos, RW864 (5'-GCACTCTTATAGTCTTTGATATAGTAC-3'-SEQ ID NO: 4) y RW865 (5'-AGCCGGGGCAGAAATGTATG GGAATTGGCAC-3' SEQ ID NO: 5). El fragmento de PCR de 500 pb, que contenía una porción interior del gen gp160, se generó a partir del 133-3 con los oligonucleótidos RW866 (5'-ATACATTTCTGCGCCCCGGCTGGT TTTGCGATTC-3'-SEQ ID NO: 6) y RW867 (5'-GAAGAATTC CCCTCCA CAATTAAAAC-3'-SEQ ID NO: 7). El fragmento de PCR de 1.450 pb, que contenía el extremo 3' del gen gp160, se generó a partir del p133-B1 con los oligonucleótidos, RW869 (5'-TGTGGAGGGGAATTCT45 TCTACTGTAATAC AACACAAC-3'-SEQ ID NO: 8) y RW836 (5'-ATCATCATCGGAT CCCGGGGTTATAGCAAAGCCCTTTC3'-SEQ ID NO: 9). El extremo 3' del fragmento de PCR de 570 pb PCR solapa con el extremo 5' del fragmento de PCR de 140 pb. El extremo 3' del fragmento de PCR de 140 pb PCR solapa con el extremo 5' del fragmento de PCR de 500 pb. El extremo 3' del fragmento de PCR de 500 pb solapa con el extremo 5' del fragmento de PCR de 1.450 pb. El plásmido generado mediante esta manipulación se denomina pRW997.

Después se sustituyó la secuencia que codifica para gp41 con la secuencia que codifica para la región transmembrana (TM) de gp 160. Se consiguió esta modificación mediante la clonación de un fragmento de PCR digerido con *Mfe*I-*Hind*III de 200 pb, que contenía el extremo 3' del gen gp 120 y la secuencia TM, en el fragmento de *Mfe*I-*Hind*III de 4.400 pb. Se generó este fragmento de PCR a partir de dos fragmentos de PCR solapantes (un fragmento de 170 pb y un fragmento de 125 pb) con los oligonucleótidos, HIVP97 (5'-TAGTGGGAAAGAGATCTTCAGACC-3'-SEQ ID NO: 10) y HIVP101 (5'-TTTTAAGCTTTTATCCCTGCCTAACTCTATTAC TAT-3'-SEQ ID NO: 11). Se generó el fragmento de PCR de 170 pb a partir de pRW997 con los oligonucleótidos, HIVP97 (5'-TAGTGGGAAAGA GATCTTCAGACC-3'-SEQ ID NO: 12) y HIVP100 (5'-CCTCCTACTATCATTATGAATATTCTTTTTTCTCTCTG CACCCTCT-3'-SEQ ID NO: 13). Se generó el fragmento de PCR de 125 pb a partir de pRW997 con los oligonucleótidos, HIVP99 (5'-AGAGTGGTGCAGAGAGAAAAA AGAATATTCATAATGATAGTAGGAGGC-3' - SEQ ID NO: 14) y HIVP101 (5'-TTTTAAGCTTTTA TCCCTGCCTAACTCTATTCACTAT-3'-SEQ ID NO: 15). El plásmido generado mediante esta manipulación se denomina pHIV71.

Después se clonó el gen gp120+TM con el promotor H6 entre los brazos flanqueantes de C3, en un plásmido que contiene el gen *gag*/(pro) de VIH-1 con el promotor I3L. Se llevó a cabo esta modificación mediante clonación del fragmento de *Nru*I-*Xho*I de 1.600 pb de pHIV71, que contenía el gen gp120+TM con el promotor H6, en el fragmento de *Nru*I-*Xho*I de 8.200 pb de pHIV63. El plásmido generado mediante esta manipulación se denomina pHIV76 (figura 10). Se usó el plásmido pHIV76 en experimentos de recombinación *in vivo* con ALVAC (CPpp) como virus de rescate para dar vCP1453.

La secuencia de las regiones nef/pol se muestra en la figura 12 y las secuencias E3L y K3L se muestran en la figura 13. Para generar ALVAC(2)120(BX08)GNP (vCP1579), se subclonan los casetes de expresión que consistían en las combinaciones del gen VIH-1/promotor en un plásmido donador ALVAC, que después se usó para insertar los casetes de expresión en sitios definidos en el genoma de ALVAC mediante la recombinación *in vitro* tal como se ha descrito previamente (Ref 20).

ES 2 282 251 T3

Ejemplo 5

Este ejemplo describe los resultados de los regímenes de inmunización.

5 Se asignaron al azar grupos de cuatro animales (macacos) cada uno a siete grupos de vacunas tal como se ilustra en la tabla 1. En esta tabla, "ADN BX08" se refiere a pCMV3BX08, preparado tal como se describe en el ejemplo 1, "VLP BX08" se refiere a los pseudoviriones producidos mediante el vector de expresión p133B1 en las células Vero, tal como se describe en el ejemplo 3, y "ALVAC(2) BX08" se refiere a vCP1579, preparado tal como se describe en el ejemplo 4. Se recogieron muestras de suero de referencia (presangrado) en las semanas -6 y -2 antes de la vacunación.
10 Se administraron las inmunizaciones primarias con las diversas vacunas en las semanas 0 y 4 con refuerzos en las semanas 24 y 44 (figuras 5A, 5B). Se inmunizaron las vacunas intramuscularmente en un cuadriceps de cada mono macaco.

15 Se prepararon los sueros a partir de sangre completa usando tubos de recogida SST y se analizaron usando transferencias de tipo Western para VIH-1 disponibles comercialmente. Los grupos 1, 2 y 7 mostraron niveles bajos de anticuerpos anti-Env tras el primer refuerzo (figuras 6 y 7). Basándose en los valores de ELISA, los niveles de anticuerpos anti-env estaban por debajo de $1 \mu\text{g/ml}$ de IgG específicas. Se detectaron altos niveles de anticuerpos anti-gag en los grupos 1, 2, 3, 4, y 7 (figuras 6 y 7). No se detectaron anticuerpos específicos de VIH-1 en los grupos 5 y 6 (figura 6).
20

Se realizó un ensayo para comprobar la capacidad de los anticuerpos obtenidos a partir de los monos inmunizados para neutralizar el virus VIH-1BX08 en CMSP humanas basándose en la reducción de los niveles de p24.

25 Se llevó a cabo el ensayo de neutralización esencialmente tal como se describe en la referencia 18. Brevemente, se mezclaron las diluciones de suero con VIH-1 BX08 y se incubaron las mezclas durante 1 hora, después se añadieron a células CMSP humanas sensibles. Se registraron los títulos como la dilución de suero a la que p24 se redujo en un 80%. Se sometieron a ensayo las muestras de suero en diluciones del virus 1:2, 1:8 y 1:32 (diluciones 1:6, 1:24 y 1:26 tras la adición de las células). Se evaluaron los niveles de p24 mediante un ensayo de ELISA específico para p24.
30

La vacunación de ADN por sí misma, grupo 5, y la de ALVAC por sí misma, grupo 6, no tenía monos que mostraran una reducción de los niveles de p24 mayores del 80%. El grupo 4, con baja cantidad de ADN (600 mg) más ALVAC, tampoco mostró monos con más de un 80% de reducción de los títulos de p24. Las VLP más ADN, o bien a dosis altas o bien a dosis bajas (grupos 1 y 2) mostraron un aumento en la reducción de los niveles de p24 comparado con las VLP solas, grupo 7. Una dosis alta de ADN, grupo 3, en combinación con ALVAC aumentó la capacidad para obtener anticuerpos neutralizantes del virus o de la p24 con respecto a una dosis baja, grupo 4 o a ALVAC solo, grupo 6. Estos resultados indican que la vacunación con ADN en combinación con VLP o ALVAC aumenta los niveles de anticuerpos neutralizantes del virus tal como se indica mediante la reducción de los niveles de p24 en los sueros de los monos inmunizados.
40

Se calcula el porcentaje de reducción de p24 en relación a la cantidad de p24 producida en presencia de la correspondiente dilución de las muestras de la semana 2.

Sumario de la descripción

45 Como sumario de esta descripción, la presente invención proporciona composiciones inmunogénicas novedosas para generar niveles de anticuerpos neutralizantes del virus frente a un aislado primario de VIH, que ha de usarse según los procedimientos de inmunización específicos. Los vectores usados en ello y para la generación de los componentes para su uso en dichas composiciones también se describen. Las modificaciones obvias son posibles dentro del alcance de esta invención.
50

55 (Tabla pasa a página siguiente)

60

65

ES 2 282 251 T3

TABLA 1

Diseño del estudio

Número del grupo	Semana de tratamiento 0, 4	Semana de tratamiento 24, 44
1	3 mg de ADN BX08 50 µg de VLP BX08 100 µg de QS21	3 mg de ADN BX08 50 µg de VLP BX08 100 µg QS21
2	600 µg de ADN BX08 50 µg de VLP BX08 100 µg de QS21	600 µg de ADN BX08 50 µg de VLP BX08 100 µg de QS21
3	3 mg de ADN BX08	ALVAC(2) BX08 (1x10 ⁸ ufp)
4	600 µg de ADN BX08	ALVAC(2) BX08 (1x10 ⁸ ufp)
5	3 mg de ADN BX08	3 mg de ADN BX08
6	ADN control	ALVAC(2) BX08 (1x10 ⁸ ufp)
7	50 µg de VLP BX08 100 µg de QS21	50 µg de VLP BX08 100 µg de QS21

TABLA 2

Número de monos que muestran >80% de reducción del título de p24

Número del grupo	Sangrado semana 26	Sangrado semana 44
1	3/4	3/4
2	3/4	4/4
3	2/4	2/4
4	0/4	0/4
5	0/4	0/4
6	0/4	0/4
7	2/4	3/4

Bibliografía

1. UNAIDS, WHO. AIDS epidemic update: December 1999. Geneva: World Health Organisation; 1999.
2. Heyward *et al* 1998. HIV vaccine development and evaluation: realistic expectations. *AIDS Res Hum Retrivir* 14: S205-S210.
3. Haigwood NL and Zolla-Pazner S. 1998. Humoral immunity to HIV, SIV and SHIV. *AIDS* 12: S121-S132.
4. Johnson *et al.* 1998. Cellular immune responses to HIV-1. *AIDS* 12: S113-120.
5. Keefer, M. *et al* 1996. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 12: 683-693.
6. Cox W. *et al* 1993. *Virology* 195: 845-850.
7. Graham BS, Keefer MC, McElrath MJ, Gorse GJ, Schwartz DH, Weinhold K, Matthews TJ, Esterlitz JR, Sinangil F, Fast PE. 1996. *Ann Intern Med* Aug 15; 125(4): 270-9.
8. Pincus SH, Messer KG, Cole R, Ireland R, VanCott TC, Pinter A, Schwartz DH, Graham BS, Gorse GJ. 1997. *J Immunol* 1997 Apr 1; 158(7): 3511-20.

ES 2 282 251 T3

9. **Fang ZY et al.** 1999. *J Infect Dis.* 180(4): 1122-32.
10. **Rovinski B et al.** 1995. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 11: 1187-1195.
- 5 11. **Arp J. et al.** 1999. *Viral Immunology* 12(4): 281-296.
- 11b. **Caver T et al.,** 1999. *Vaccine March* 1999; 17: 1567-1572
12. **Zolka-Pazner et al.,** *J. Virology*, vol. 72: 1052-1059, 1998.
- 10 13. **Karin M and Richards RI.** Human metallothionein genes - primary structure of the metallothionein-II gene and a related processed gene. *Nature* 1982; 299: 797-802.
- 15 14. **Sambrook J et al.** *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Second Ed.: Cold Spring Harbour *Laboratory Press.* 1989.
15. **Haynes JR, Cao SX, Rovinski B, Sia C, James O, Dekaban GA, Klein MH.** Production of immunogenic HIV-1 viruslike particles in stably engineered monkey cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991; 7: 17-27.
- 20 16. **Persson R, Cao S, Cates G, Yao F, Klein M, Rovinski B.** Modifications of HIV-1 Retrovirus-like Particles to Enhance Safety and Immunogenicity. *Biologicals* 1998, 26(4): 255-265.
17. **Southern PJ and Berg P.** Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Molec Appl Genet* 1982; 1: 327-341.
- 25 18. **Graham, B.S. et al,** 1993, *J. Infection Des.* 167: 533-537.
19. **Tartaglia, J. et al.,** 1992, *Virology*, 188: 219-232.
- 30 20. **Piccini, A. et al.,** 1987, *Methods in Enzymology* 153: 545-563.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de (i) una molécula de ADN que codifica para una glucoproteína de envuelta de un aislado primario de VIH-1 y (ii) un virus ALVAC atenuado que expresa al menos una glucoproteína de envuelta de un aislado primario de VIH-1 en la fabricación de un medicamento para generar un nivel de anticuerpos que neutraliza el virus para el VIH-1 en un huésped mediante un tratamiento que comprende:

10 (a) al menos una administración de la molécula de ADN que codifica para una glucoproteína de envuelta de un aislado primario de VIH-1 como antígeno de cebado,

(b) dejar que el huésped repose para permitir la expansión clonal de las células B precursoras específicas para el antígeno de cebado,

15 (c) al menos una administración al huésped cebado del virus ALVAC atenuado que expresa al menos una glucoproteína de envuelta de un aislado primario de VIH-1 como antígeno de refuerzo para proporcionar los niveles neutralizantes de anticuerpos.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que el aislado primario de VIH-1 es BX08.

20 3. Uso según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el huésped reposa durante un periodo de 2 a 12 meses.

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que el antígeno de refuerzo se administra al menos dos veces.

25 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha molécula de ADN está contenida en un vector plasmídico bajo el control de un promotor heterólogo para la expresión de la glucoproteína de envuelta en el huésped.

6. Uso según la reivindicación 5, en el que el promotor heterólogo es el promotor del citomegalovirus.

30 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el vector es pCMV3Bx08 mostrado en la figura 2.

8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el antígeno de cebado se administra al menos dos veces y en el que el huésped reposa para permitir la expansión clonal de la población de células B precursoras específicas para el antígeno de cebado tras cada administración de dicha administración de cebado.

35 9. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el vector de virus de la viruela aviar atenuado contiene un genoma de VIH modificado con déficit en repeticiones terminales largas, en el que al menos el gen *env* es el del aislado primario BX08.

40 10. Uso según la reivindicación 9, en el que el virus ALVAC atenuado es vCP1579.

45

50

55

60

65

Plásmido pCMV .Bx08.gp160

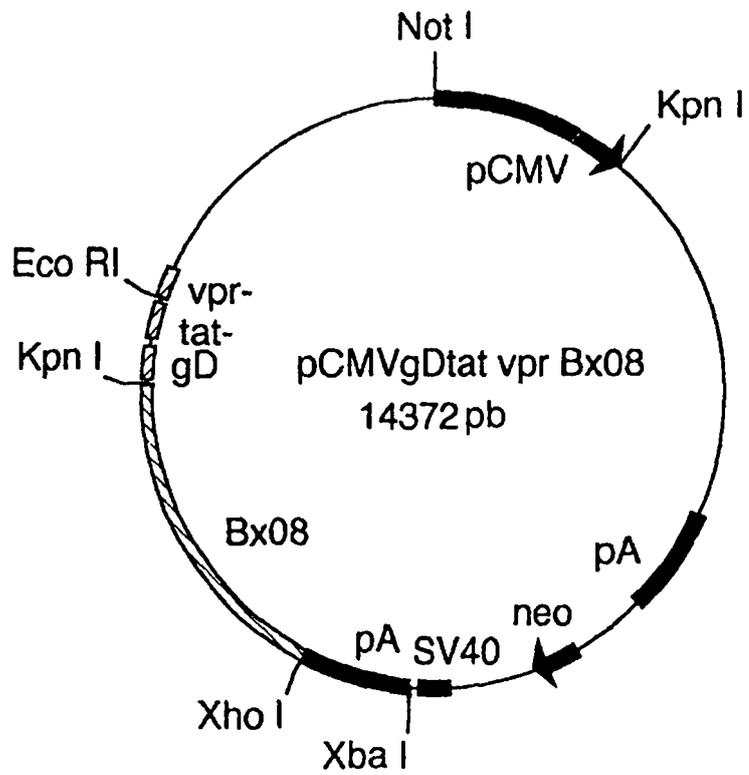


FIG.1

Plásmido de inmunización con ADN pCMV3Bx08.

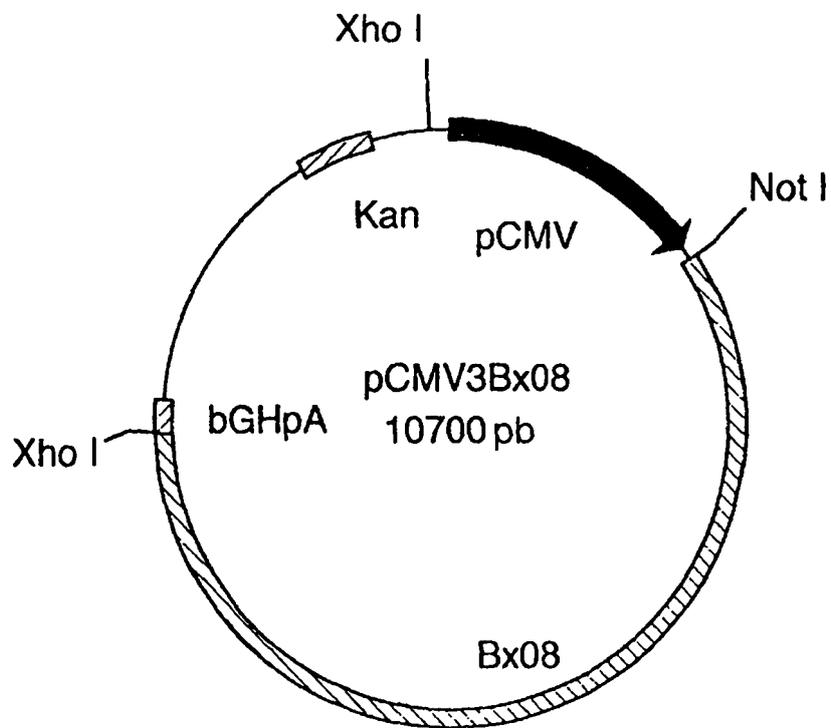


FIG.2

Plásmido de expresión de pseudovirión p133B1 HIV-1 Bx08

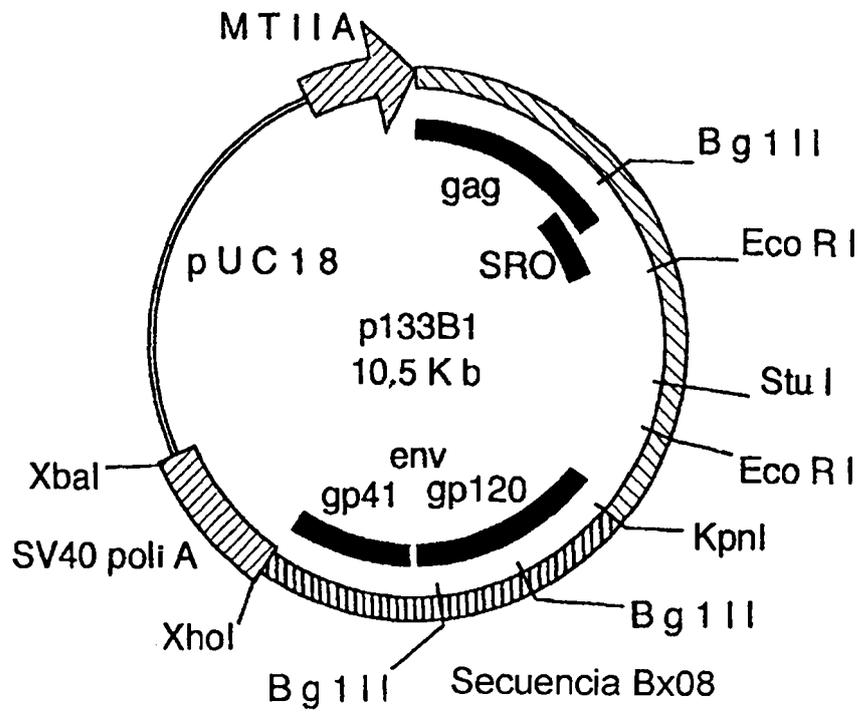


FIG.3

ALVAC(2)120(BX08)GNP
(VCP1579)
(mapa de restricción de XhoI de ALVAC)

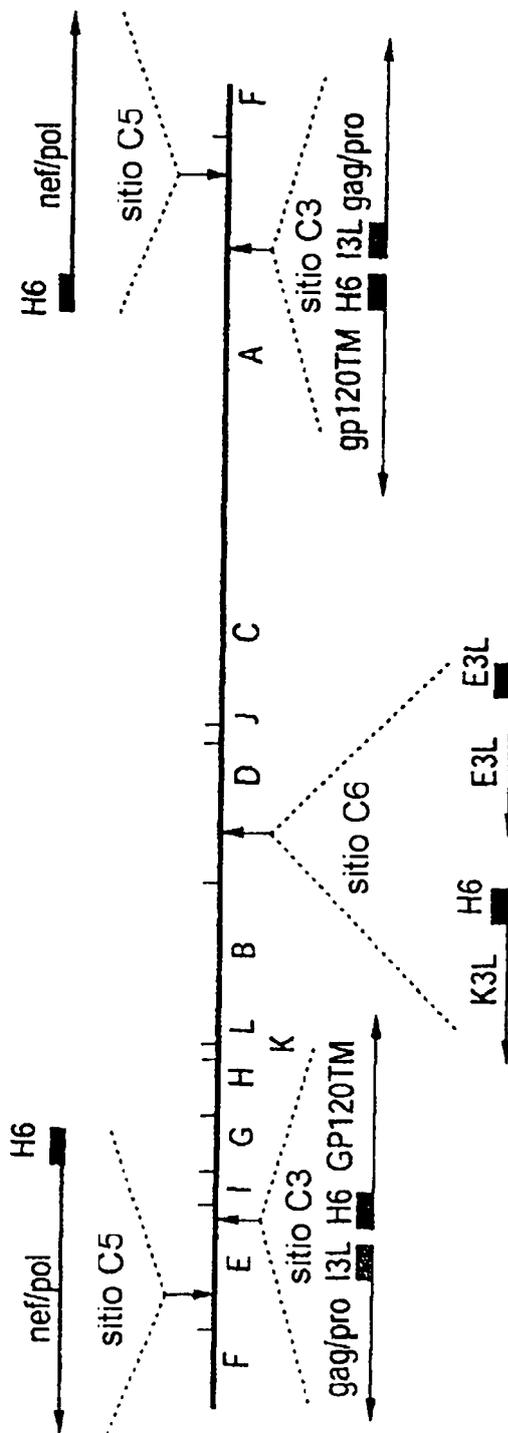


FIG.4

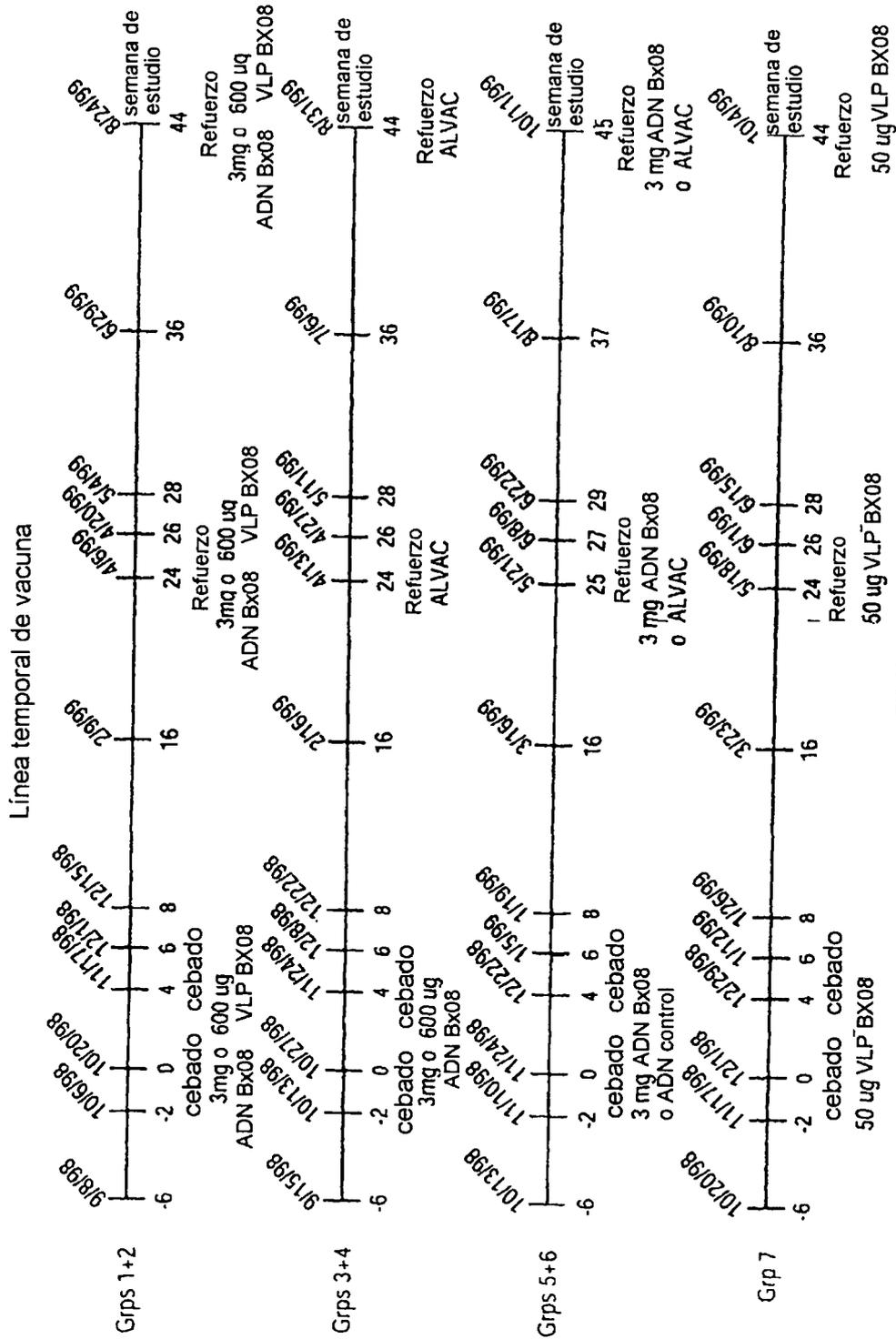


FIG.5A

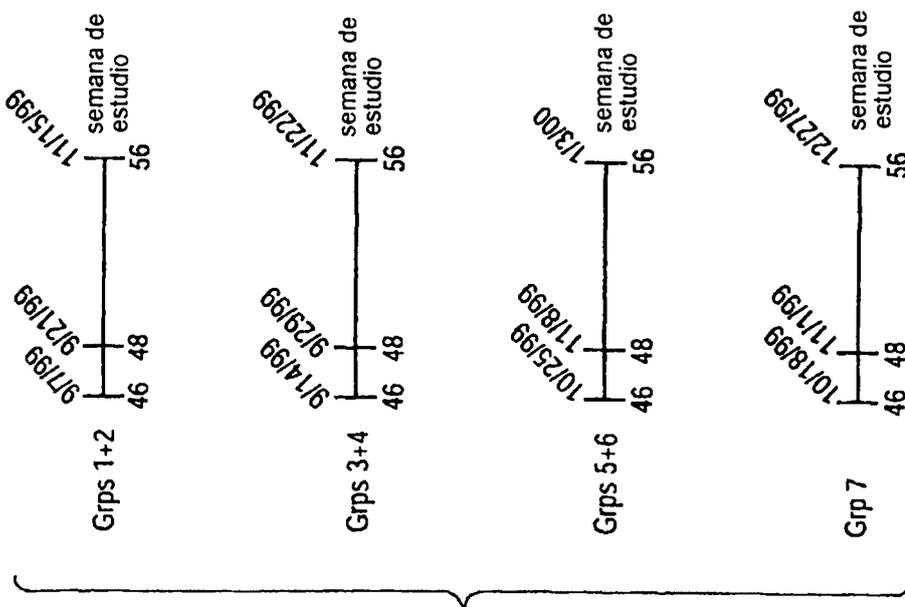
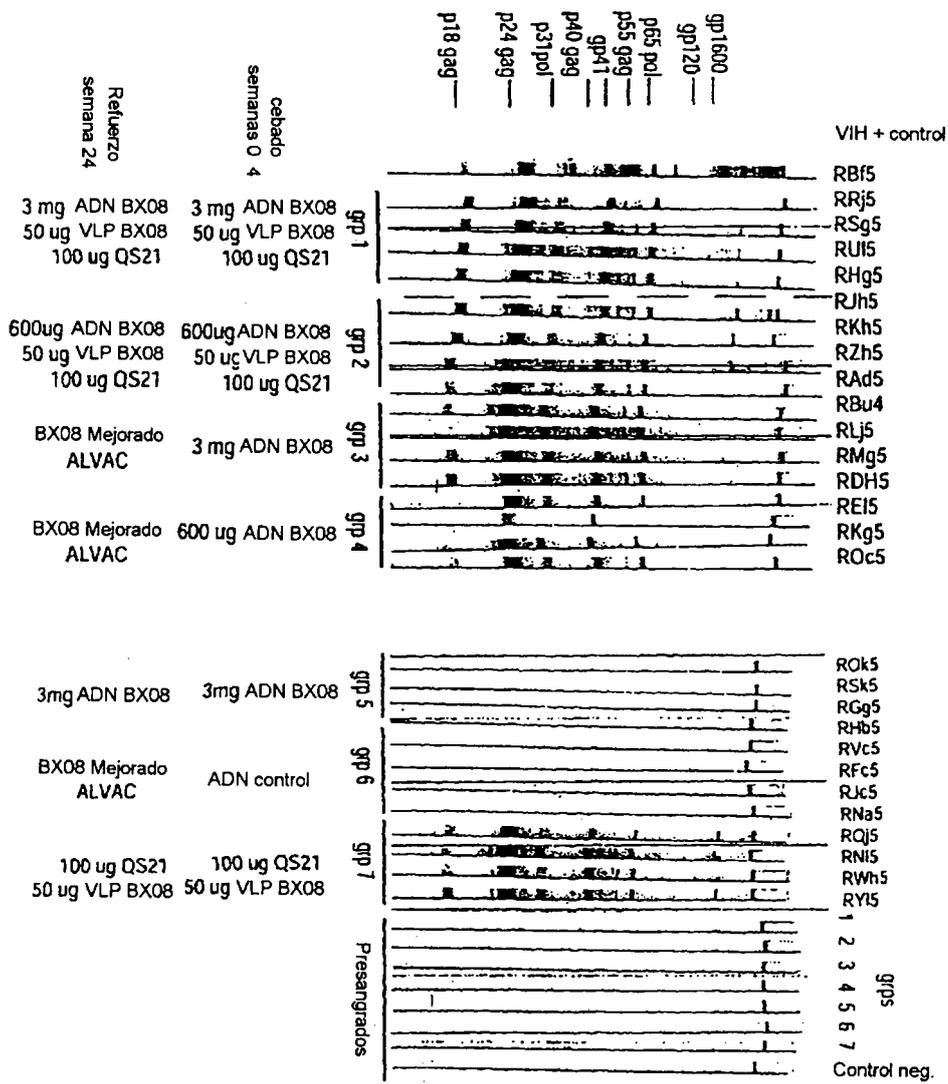


FIG.5B

FIG.6



Inmunorreactividad frente a antígenos de VIH1 de suero de macaco de semana 26
(dil 1:1000)

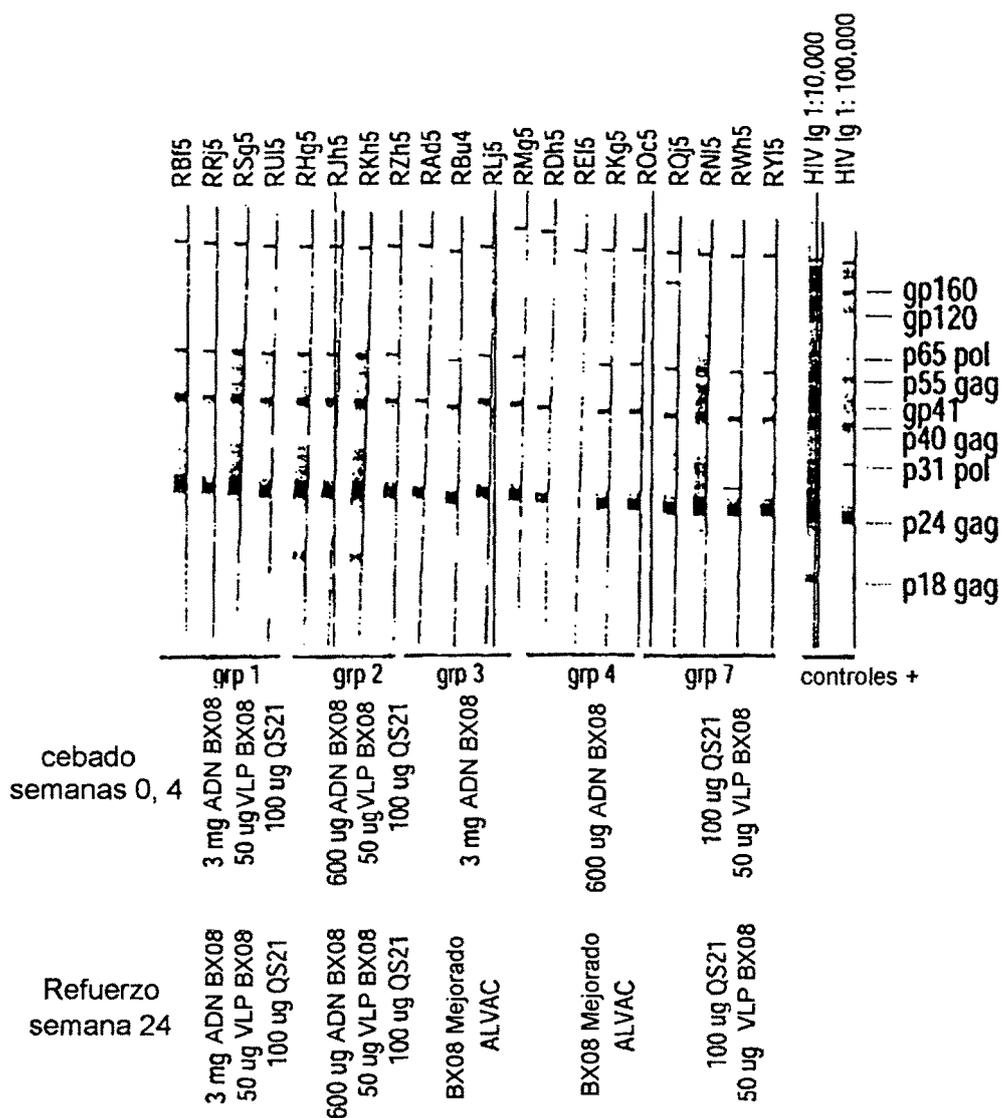


FIG.7

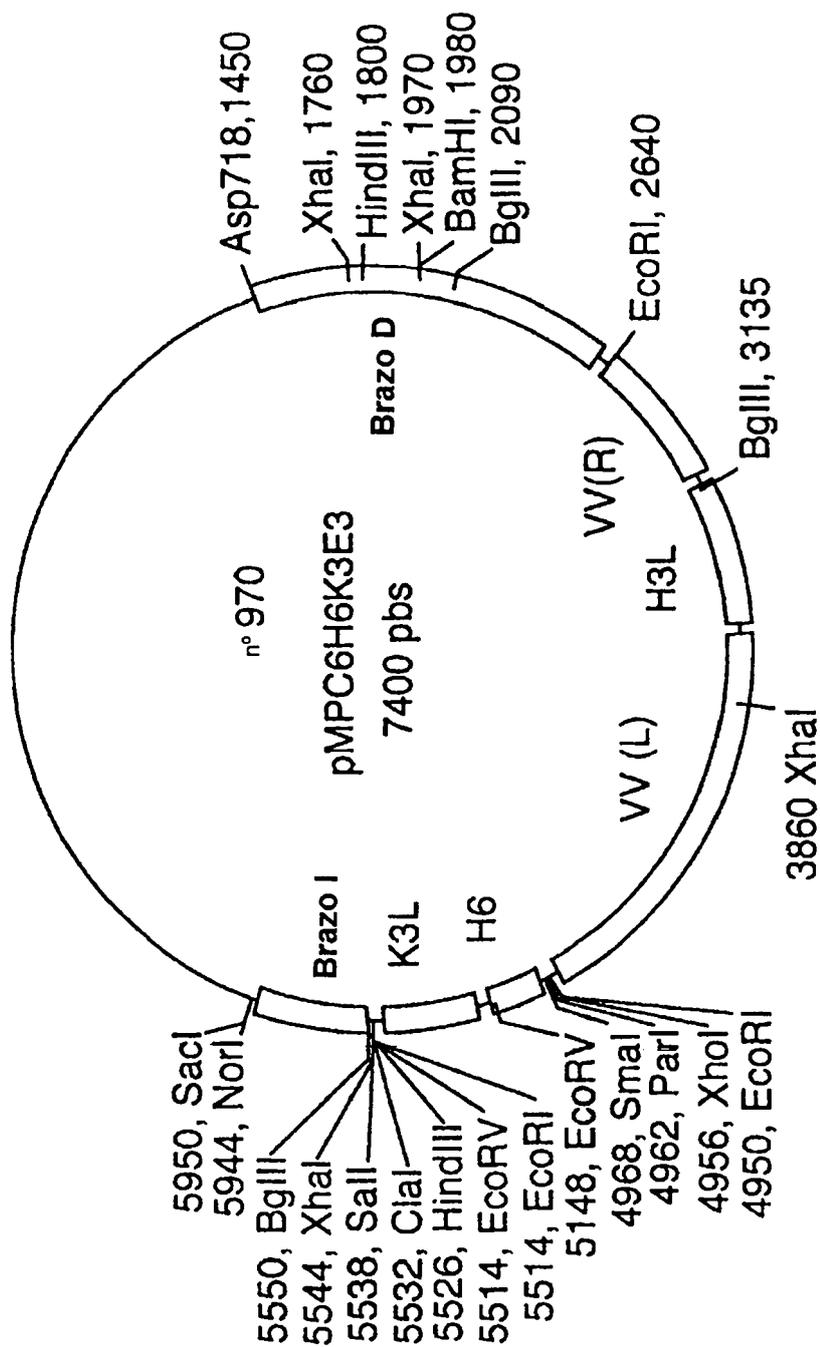


FIG.8

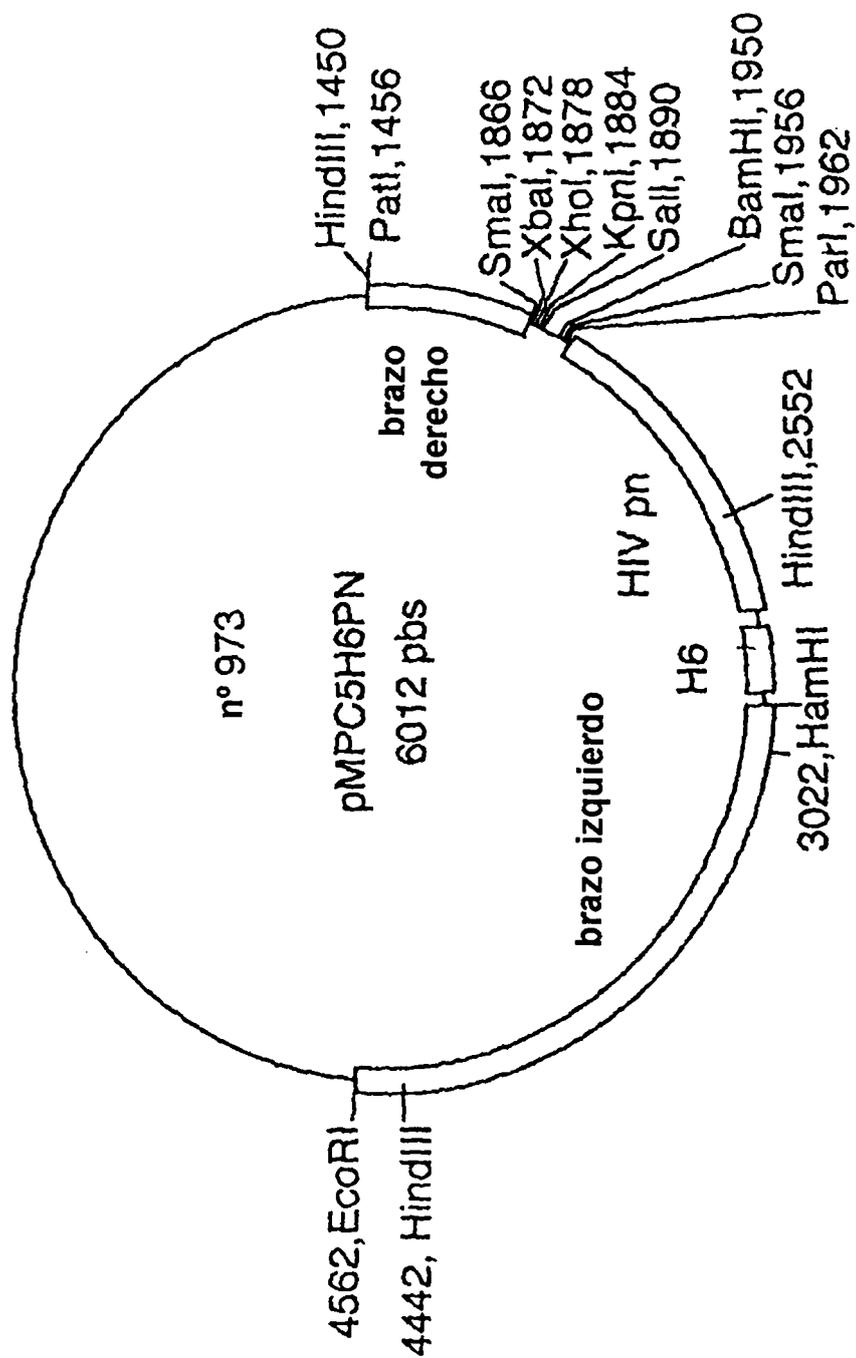


FIG.9

Plásmido pHIV76

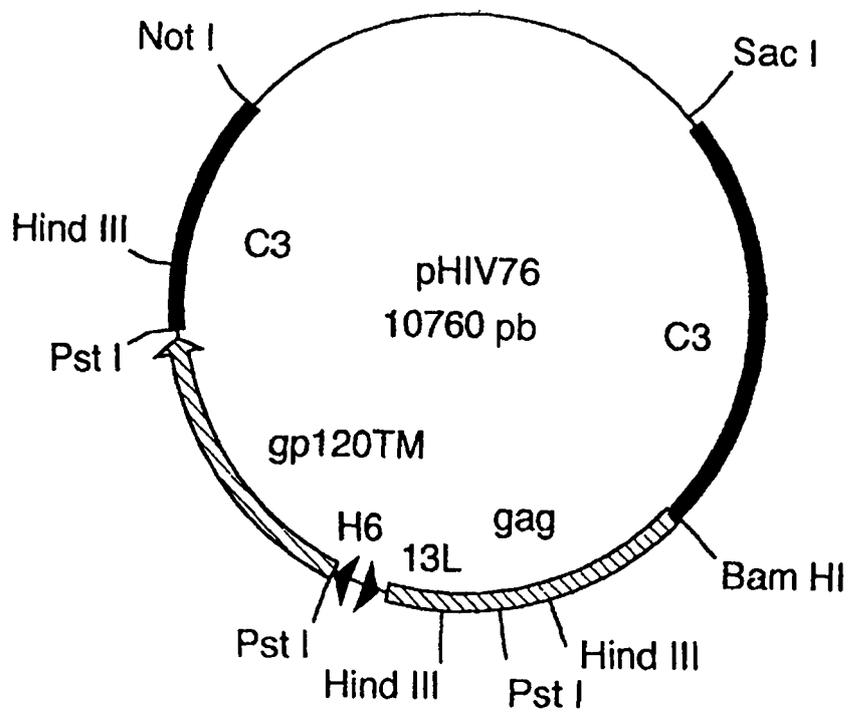


FIG.10

ES 2 282 251 T3

Figura 11

vCP1579 : Casete de epítopo Pol/nef de H6/VIH en el sitio C5 de ALVAC

```

1 TTTTTCAT TATTAGAAA TTATGCATT TAGATCTTTA TAAGCGGCCG TGATTAACTA
61 GTCATAAAAA CCCGGGATCG ATTCTAGACT CGAGGGTACC GGATCTTAAT TAATTAGTCA
121 TCAGGCAGGG CGAGAACGAG ACTATCTGCT CGTTAATTAA TTAGGTCGAC GGATCCCCCA
181 ACAAAAATA ATCAGCTATC GGGGTTAATT AATTAGTTAT TAGACAAGGT GAAAACGAAA
241 CTATTTGTAG CTTAATTAAT TAGAGCTTCT TTATTCTATA CTTAAAAAGT GAAAATAAAT
301 ACAAAGGTTT TTGAGGGTTG TGTTAAATG AAAGCGAGAA ATAATCATAA ATTATTCAT
361 TATCGCGATA TCCGTTAAGT TTGTATCGTA ATGCCACTAA CAGAAGAAGC AGAGCTAGAA
421 CTGGCAGAAA ACAGAGAGAT TCTAAAAGAA CCAGTACATG GAGTGTATTA TGACCCATCA
481 AAAGACTTAA TAGCAGAAAT ACAGAAGCAG GGGCAAGGCC AATGGACATA TCAAATTTAT
541 CAAGAGCCAT TAAAAATCT GAAAACAGGA ATGGAGTGGG GATTTGATTC TAGATTAGCA
601 TTTTCATCAG TAGCTAGAGA ATTACATCCT GAATATTTA AAAATTGTAT GGCAATATTC
661 CAAAGTAGCA TGACAAAAAT CTTAGAGCCT TTTAGAAAAC AAAATCCAGA CATAGTTATC
721 TATCAATACA TGGATGATTT GTATGTAGGA TCTGACTTAG AAATAGGGCA GCATAGAACA
781 AAAATAGAGG AGCTGAGACA ACATCTGTTG AGGTGGGGAC TTACAACCAT GGTAGGTTTT
841 CCAGTAACAC CTCAGTACC TTTAAGACCA ATGACTTACA AAGCAGCTGT AGATCTTCT
901 CACTTTTAA AAGAAAAGG AGGTTTAGAA GGGCTAATTC ATTCTCAAG AAGACAAGAT
961 ATTCTTGATT TGTGGATTTA TCATACACAA GGATATTTT CTGATTGGCA GAATTACACA
1021 CCAGGACCAG GAGTCAGATA CCCATTAACC TTTGGTTGGT GCTACAAGCT AGTACCAATG
1081 ATTGAGACTG TACCAGTAAA ATTAAGCCA GGAATGGATG GCCCAAAGT TAAACAATGG
1141 CCATTGACAG AAGAAAAAAT AAAAGCATTA GTAGAAATTT GTACAGAGAT GGAAAAGGAA
1201 GGGAAAATTT CAAAAATTGG GCCTTAATTT TTCTGCAGCC CGGGGGATCC TTTTATAGC
1261 TAATTAGTCA CGTACCTTTG AGAGTACCAC TTCAGTACC TCTTTTGTGT CTCAGAGTAA
1321 CTTTCTTTAA TCAATTCCAA AACAG

```

Secuencia flanqueante en el sentido de 5' (derecha): 1-266

Promotor VV H6: 267-390

Casete pol/nef/pol/nef/pol de VIH: 391-1227

Secuencia flanqueante en el sentido de 3' (izquierda): 1227-1345

ES 2 282 251 T3

Figura 12

Genes E3L y K3L en C6

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110
GAGCTCGCG CCGCCTATCA AAAGTCTTAA TGAGTTAGGT GTAGATAGTA TAGATATTAC TACAAGGTA TTCATATTTC CTATCAATTC TAAAGTAGAT GATATTAATA
CTCGAGCCGC GGGGATAGT TTTGAGAATT ACTCAATCCA CATCTATCAT ATCTATAATG ATGTTTCCAT AAGTATAAAG GATAGTTAAG ATTTCATCTA CTATAATTAT

      120     130     140     150     160     170     180     190     200     210     220
ACTCAAAGAT GATCATAGTA GATAATAGAT AGGCTCATAT AATGACTOCA AATTGCGAGS GTTCACATTT TAATCATCAC GCGTTCATAA GTTTCACACTG CATAGATCAA
TGAGTTCTTA CTACTATCAT CTATTATCTA TCGGAGTATA TTAATCAAGT TTAANAACCTC CAAGTGTAAG ATTAGTAGTG CCGCAAGTATT CAAAGTTGAC GTATCTTACTT

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400     410     420     430     440
AATTCACACTA AAAGCATAGC CGATGTATTT GAGAGAGATT GAGACATCAA CTAGCCTAAA GAAATTCAGS TTATRAATTA TACATAATGS ATTTTGTATY CATCGATTAT
TTAGAGTGAT TTTTCTATCG OCTACATAAA CTCTCTCDA CCTGTGATTT GATCGGATTT CTTTAAAGTC AATATTATTAT ATGTATTATCC TAAACAATTA GTAGTCAATA

      340     350     360     370     380     390     400     410     420     430     440
ATTTACACTA AGTACATRAA AAAGTATTTA ATAAANATC TTAATTAAGA AAANAAGCT AATTAGCTAT AAAAAGCCAG ATCTCTGAG GTCCAGCGTA TCGATAGCT
TAAATTGTAT TCAATGTATT TTTTATAATT TATTTTTATG AATGAATGCT TTTTACTAGA TDAATGATA TTTTGGGTC TAGAGAGCTC CAGCTGCCAT AGCTATYCCA

      450     460     470     480     490     500     510     520     530
TGATATGAAA TCAATAAAAA TT A TTG ATG TCT ACA CAT CCT TTT GTA ATT GAC ATC TAT ATA TCC TTT TGT ATA ATC AAC TCT AAT CAC TTT
ACTATAGCTT ANGTATTTTT AA T AAC TAC AGA TGT GTA OGA AAA CAT TAA CTG TAG ATA TAT AGG AAA ACA TAT TAG TTG AGA TTA GTG AAA
<O H R C M X X Y H V D I Y G K T Y D K
-----E3L-----

      540     550     560     570     580     590     600     610     620
AAC TTT TAC AGT TTT CCC TAC CAG TTY ATC CCT ATA TTC AAC ATA TCT ATC CAT ATG CAT CTT AAC ACT CTC TCC CAA GAT ACC TTC AGA
TTG AAA ATG TCA AAA GGG ATG GTC AAA TAG OGA TAT AAG TTG TAT AGA TAG GTA TAC GTA GAA TTG TGA GAG ACG GTT CTA TCG AAG TCT
<V K V T E G V L E D R Y E V Y R D H H M K V S E A L I A E S
-----K3L-----

      630     640     650     660     670     680     690     700     710
GTC AGG ATA GTC AAA AAG ATA AAT GTA TNG AGC AEA ATC CTT CTC GTA TAC TCT GCC CTT TAT TAC ATC GCG CCC ATT GGG CAA CGA ATA
CAC TCC TAT CAG TTT TTC EAT TTA CAT ATC TCG EAT TAG GAA GAG CAT ATG MGA CGG GAA ATA ATG TAG CGG GCG TAA CCC GTT GCT TAT
<H P Y D F L Y I Y L A Y D E E Y V E G K I V D G A H P L S Y
-----E3L-----

      720     730     740     750     760     770     780     790     800     810
ACA AAA TGC AAG CAT ACG ATACAACTT AAGGATATC GCGATATGA AATAATTAT GATTATTCT CCGTTCAAT TTAACACAC CCTCAAGAAC
TGT TTT ACG TTC GTA TGC TATGTTTGA TYOCTATAG CQCTATTACT TTTTAATAA CTAATTAAGA GCGAAGTTA AATTGCTGTG CGAGTCTCTG
<C F A L M
-----E3L-----

      820     830     840     850     860     870     880     890     900     910     920
CTTGTATTT AHTTCACTT TTTAAGTATA GAATAAGAA AGCTCTAATT AATTAATGAA CAGTGTGTT CTTTTTCCC TTGCGTATC ACTAATTAAT TAACCGGCG
GAAACATAA TAAAGTGAA AAATTCATAT CTATTTCCT TCGAGATTA TAAATACTT GTCTAACAAA GCAAAAGCGG AACCGCATAG TGAATTAATA ATTGGCCCG

      930     940     950     960     970     980     990     1000    1010    1020    1030
TCGACTGTA GAAATTCAG TATATGACA TATTTCATTT GTATACACAT AACCAATTA AACGTAGAAT GTATAGGAG AGATGTAAAG GGAACAGGT TTTGTGATC
ACGTGAGCT CTTAAGTTG ATATAACTTT ATAAAGTAAA CATATGTGTA TTGGIAATGA TTGCATCTTA CATATCTCTC TCTACATTCG CCTTGTCCCA AACAACAAAG

      1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120    1130    1140
GCAACTATT CTAATCATA ATCTCTCTG TATATGTTT TCGAGTAAT CTATTATGA TCGGAGATA TCTATATAAT TATTTTGA AATGATGTA ACTATGCT
CGTTGATAA GATTATGAT TAAGAAGACA ATATGCGAA AGTGCATTA GATATATCT ACGTCTAT AGATATATTA ATAAACATT CTACTACAT TGATACACTA

      1150    1160    1170    1180    1190    1200    1210    1220    1230    1240    1250
CTATATAAGT AGTGAATAA TTAAGTATT TCGATATAG TTCCAACTCT GTCTCTGTA TGCTAGTIT CTAATATCT ATAGCATCTT CAAAATAT ATTCOCAT
GATATATCA TCACATATT AAGTACATA ACCATATAC AAGTTGAGA CAGAAACACT ACAGATCAA GCATTATGA TATGTAAGA GTTTTTATA TAAGGTATA

      1260    1270    1280    1290    1300    1310    1320    1330    1340    1350    1360
ATTCOCAGT CTTCACTCT ATCTCTAAA AAATCTCAA CQZATGGAT ATAAATATCT AHTTCACTC TTTGATATC ATTAATGATA TAGTTTTGA CACTATCTC
TAAAGTTCA GAGTCAAGA TAGAAGATT TTTAAGATT GATACCTTA TAITTATGA TAAATGGAG AAGACTATAG TAATTAAT ATCAAAACT GTGATAGAG

      1370    1380    1390    1400    1410    1420    1430    1440    1450    1460    1470
TGTCAATGA TTTTATTA CTATATCTAA GAACCGATA GGTTCCTAG GACGAACACT TGCCATTAAT ATCTCTATA TAGCTCTGG ACATAATCA TCTATTAC
ACAGTTAAT ANGAATAAGT GATATAGAT CTTTGCTAT CCGAGGATC CTCTCTGAT ACGGTAATTA TAGAGATAAT ATCCGAAGACC TGTATTACT AGATAATG

      1480    1490    1500    1510    1520    1530    1540    1550    1560    1570    1580
CAGATTAAT GCGAATATT CCFATCTT CTAAGTAT TTTAAGAAAG TCAGAACTA AGACCTGAT TTCATATTT GGTTCATCA TGAATGATC TCTATTGAT
GTCTAATAA CCTTGATAA GCGATAGATA GATTGTATA AAATCTTTC AGCTTAGAT TCTGACTAC AAGTATAAA CCAAGTATGT ACTTACTAG AGATAACTAC

```

ES 2 282 251 T3

```

1590      1600      1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680      1690
ATAGTGAATA TTTCATTCTC TGAATAATGG TAACTCAATC TATATATGCT TTCTCTGTTG ATGAAGGATA GAATATATCT AATAGAATTT GTACCAACAA ACTGTTCTCT
TATCACTGAT AAAGTAAGAG ACTTTTAAAC ATTGAGTAGG ATATATAGCA AAAGAAACAAC TACTTCTCAT CTATATATCAG TTATCTTAAA CATGTTGTTT TGACAAGAGA

1700      1710      1720      1730      1740      1750      1760      1770      1780      1790      1800
TATCAATCTG ATATCATCAT CTGAATAAT CATGTAGGCG ATACATTEAA CAATTAGAGA CTGTCTCTCT GTTATCAATA TACTATTCTT GTGATAATTT ATGTGTGAGG
ATACTTAGCA TAAAGTAGTA GACTTTATTA GTACATTCCG TATGTAAATT GTTAATCTCT GAACAGAGGA CAATAGTTAT ATGATAAGAA CACTATTAAA TAGCACTCC

1810      1820      1830      1840      1850      1860      1870      1880      1890      1900      1910
CAAAATTTCT CAGCTTCTTT AATTTTGTTA TGTAGATAT CAATTCOAAT CGAGCTACAG TTCTTGGCTT AAACAGATAT ACTTTTCTTC GAACAAATTC TACAACATTA
GTTTAAACAG GTACAGAAAA TTAACAAAT ATCACTATA GTTTAGGITA CCTCATGTC AAGAACCAGAA TTGTCTATA TCAAAAAGAC CTGTTTAAG ATGTTTAAAT

1920      1930      1940      1950      1960      1970      1980      1990      2000      2010      2020
TTATAAAGGA CTTTGGGTAG ATAAGTGGGA TGAATTCCTA TTTTAAATTA TGCTATGGCA TTGTCTCTGT GCAAATATCC AAACCTTTT GTGATAGTAT GGCATTCATT
AATATTTCTT GAAACCCATC TATTCACCTT ACTTTAGGAT AAAATTAATT ACGATAGCGT AACAGGAGCA GGTTTATAGG TTTCGAAAA CACTATCATA CCGTAAGTAA

2030      2040      2050      2060      2070      2080      2090      2100      2110      2120      2130
GTCTAGAAAC CCTCTAAGAA TATCTGTGAC AGATATCATC TTGAGAGAA ATACTATGTC CCTTAATAGT ACTACAATTT GTATTTTFTA ATCTATCTCA ATAAAAAAT
CAGATCTTTG CGAGTACTT ATAGACACTG TCTATAGTAG AAATCTCTTA TATGATCAGC GCAATTAACA TGAATTTAAA CATAAAAAAT TAGATAGAGT TATTTTTTAA

2140      2150      2160      2170      2180      2190      2200      2210      2220      2230
TAATATGTAT GATTCOAATG ATAACATAAC TACTAAGTGT TATTGATAAC TAGAATCA GAA TCT AAT GAT GAC GTA ACC AAG AAG TTT ATC TAC TGC CAA
ATTATACATA CTAAAGTTAA TATTGATTTG ATGATTGACA ATAACTATTT ATCTTAGT CTT AGA TTA CTA CTG CAT TGG TTC TTC AAA TAG ATG ACG GTT
<P R I I V Y G L L K D V A L
-----E3L-----

2240      2250      2260      2270      2280      2290      2300      2310      2320
TTT AGC TGC ATT ATT TTT AGC ATC TCG TTT AGA TTT TCC ATC TCC CTT ATC GAA TAC TCT TCC GTC GAT GTC TAC ACA GGC ATA AAA TGT
AAA TCG ACG TAA TAA AAA TCG TAG AGC AAA TCT AAA AGG TAG ACG GAA TAG CTT ATG AGA AGG CAG CTA CAG ATG TGT CCG TAT TTT ACA
<R A A N N K A D R E S E G D A K D F V R G D I D V C A Y P T
-----E3L-----

2330      2340      2350      2360      2370      2380      2390      2400      2410
AGG AGA GTT ACT AGG CCC AAC TGA TTC AAT ACU AAA AGA CCA ATC TCT CTT AGT TAY TTG GCA GTA CTC ATT AAT AAT GGT GAC AGG GTT
TCC TCT CAA TGA TCC GGG TTG ACT AAG TTA TCC TTT TCT GGT TAG AGA GAA TCA ATA AAC CDT CAT CAG TAA TTA TTA CCA CTG TCC CAA
<P S E P G V S E I R F S W D R K Y I O C Y E M I I T V P N
-----E3L-----

2420      2430      2440      2450      2460      2470      2480      2490      2500
AGC ATC TTT CCA ATC AAT AAT TTT TTT AGC CCG AAT AAC ATC ATC AAA AGA CTT ATG ATC CTC TCT CAT TGA TTT TTC CCG GGA TAC ATC
TCC TAG AAA GGT TAG TTA TTA AAA AAA TCG GGC TTA TTG TAG TAG TTT TCT GAA TAC TAG GAG AGA GTA ACT AAA AAG CCC CCT ATG TAG
<A D E N D I R E I R D I V D D F S K N D E R M S X E R S V D
-----E3L-----

2510      2520      2530      2540      2550      2560      2570      2580      2590
ATC TAT TAT GAC GTC AGC CAT AGC ATC AGC ATC CCG CTT ATC CCG CTC CGT TGT CAT AAA CCA ACG AGG AGG AAT ATC GTC GGA GCT GTA
TAG ATA ATA CTG CAG TCG GTA TCG TAG TCG TAG GCC GAA TAG CCG GAG GCA ACA GTA TTT GGT TCC TCC TTA TAG CAG CCT CCA CAT
<D I I V D A N A D A D F K D A E T T M P W R P P I D D S E Y
-----E3L-----

2600      2610      2620      2630      2640      2650      2660      2670      2680
CAC CAT AGC ACT ACG TTG AAG ATC GTA CAG AGC TTT ATT AAC TTC TCG CTT CTC CAT ATT AAG TTG TCT AGT TAG TTG TGC AGC AGT AGC
GTC GTA TCG TGA TGC AAC TTC TAG CAT GTC TCG AAA TBA TTG AAG AGC GAA GAG GTA TAA TTC AAC AGA TCA ATC AAC ACG TCG TCA TCG
<V M A S R Q L D T L A K N V E R K S M L Q R T L Q A A T A
-----E3L-----

2690      2700      2710      2720      2730      2740      2750      2760      2770
TCC TTC GAT TCC AAT GTT TTT AAT AGC CCG ACA CAC AAT CTC TCC GTC AGA ACG CTC GTC AAT ATA GAT CTT AGA CAT TT TTADAGAGAA
AGG AAG CTA AGG TTA CAA AAA TTA TCG CCG TGT GTG TTA CAG ACG CAG TCT TCC GAG CAG TTA TAT CTA GAA TCT GTA AA AATCTCTCTT
<G R I G I N K I A A C V I E A D S R K D I Y I K S N
-----E3L-----

2780      2790      2800      2810      2820      2830      2840      2850      2860      2870      2880
CTAACACAAC CAGCAATAAA ACTGAACCTA CTATATCAT TTTTATTCA TCACTCTCTG GTGGTTCTTC GTTTCTATCC AATGTAAGTC TGAITAAACC GTCACTATA
GATGTGTTG GTGTTAATT TGACTTGGAT GAATAGTAA AAAAATAAGT AGTAAGAGAC CACCAAGCAG CAAAGATAGC TTACATCGAG ACTAATTGGC CACTAGATAT

2890      2900      2910      2920      2930      2940      2950      2960      2970      2980      2990
GGTATGCTG GTTCTGAGA TTCTGGAGA GATGATAT TATCTGGAG AAATCTCTGT ATTTCCTGT TTTCAATAT GGATTCGGT GTAACATTA GATTGCGAAA
CCACTAGAC CAAGACTCTT AAGACTCTCT CTACCTAATA ATAGACTTTC TTAGAGACAA TAAAGGAGCA AAAGTACATA GCTAACGCAA CATTGTAATT CTAACTCTT

3000      3010      3020      3030      3040      3050      3060      3070      3080      3090      3100
TGCCTAAAT TTGGAGGCT TAAAGTTTG TTGCAATCT CTACACGGT GTCTAACTAG TGGAGTTTC TCAGCTCTC TMTTTGAAT CATCTGGC GTAGTATTC
ACGAGATTA AACCTTCGA ATTTCAAC AAAGTTAGA GATGTGGCA CMAGTTGAT ACCTCAAGC ACTGACAGG ATCAAACTTA GTAGTAGCCG CATCAAGG

```

ES 2 282 251 T3

3110 . 3120 . 3130 . 3140 . 3150 . 3160 . 3170 . 3180 . 3190 . 3200 . 3210
 TACTTTTACA GTTAGGACAC GGTGTATTGT ATTTCTGGTC GAGAACTGTA AAATAATCGT TGTAACTCAC ATCCTTTATT TTATCTATAT TGTATTCTAC TCCTTTCTTA
 ATGAAAATGT CAATCCTGTG CCACATAACA TAAAGAOCAG CTCCTGCAAT TTTATTAGCA ACATTGAGTG TAGGAAATAA AATAGATATA ACATAANGTG AGGAAAGAT

3220 . 3230 . 3240 . 3250 . 3260 . 3270 . 3280 . 3290 . 3300 . 3310 . 3320
 ATGCATTFTA TACCGAATRA GAGATACCGA AGCAATTCCT TTTATTGATT AACTAGTCAA ATGAGTATAT ATBATTGAAA AAGTAAAAATA TAAATCATAT AATAATGAAA
 TACGTAAAAT ATGGCTTATT CTCCTATCGCT TCCTTAAGAA AAATAACTAA TTGATCAGTT TACTCATATA TATTAACCTT TTCATTTTAT ATTTAGTATA TTATTACTTT

3330 . 3340 . 3350 . 3360 . 3370 . 3380 . 3390 . 3400 . 3410 . 3420 . 3430
 CGAAATFCA GTTAAAGACA GGAATCGCCA GATCTTCTTT CTAATGAAGT AAGTACTGCT AAATCTCCAA AATTAGATAA AAATGATACA GCAATACAG CTTCAATCAA
 GCTTATAGT CATTATCTGT CCTTCAOCTT CTAAGAAGAA GATTACTTCA TTCATGACGA TTTAGAGCTT TTAATCTATT TTTACTATGT CGTTTATGTC GAAGTAAGTT

3440 . 3450 . 3460 . 3470 . 3480 . 3490 . 3500 . 3510 . 3520 . 3530 . 3540
 CGAATFACCT TTTAATTTTT TCAGACACAC CTTATTACAA ACTAAGTAA GTCAGATGAT AGAAAGTAAA TATAAATTTA ACTTATGGGT ATAATATAAT AAGATTCAT
 GCTTAATGCA AAATTAAGAA AGTCTGTGTG GAATAATGTT TGATGATTC AGTCTACTAC TCTTTCAATTT ATATTTAAAT TCAATACCCA TATTATATTA TTCTTAAGTA

3550 . 3560 . 3570 . 3580 . 3590 . 3600 . 3610 . 3620 . 3630 . 3640 . 3650
 GATATTAATA ATTTACTTAA CGATGTTAAT AGACTTATTC CATCAACCCC TTCAAACCTT TCTGGATATT ATAAAAATCC AGTTAATGAT ATTTAAATAG ATTGTTIAG
 CTATAATTAT TAAATGAATT GCTACAAATA TCTGAATAAG GTAGTTGGGG AAGTTTGGAA AGACCTEATAA TATTTTATGG TCAATTACTA TAATTTTIAT TAACAATTC

3660 . 3670 . 3680 . 3690 . 3700 . 3710 . 3720 . 3730 . 3740 . 3750 . 3760
 AGATCTAAT AATTATTGG AGTAAAGCA TATAAATTA GTCTATCTTT CACATGGAAA TCAATTACCT AATATTATA ATTTAGTATG GAATTTTTTA GGATTACAG
 TCTACATTA TTAATGAACC TCAATTTGCT ATATTTTAAAT GTATAGAAA GTGTACCTTT ACTTAATGGA TTATAATTAT TAATACATAT CTTAAAAAAT CCTTAAATCT

3770 . 3780 . 3790 . 3800 . 3810 . 3820 . 3830 . 3840 . 3850 . 3860 . 3870
 CTGTATATAG TATCAACAT ACGGCGGAT CTATGCTTAT GGTAAAGAC TGTAAACGGG AGCAGCATT TATGTTAACT GGCCTATGTT TAATAGCCAG ATCATTTTAC
 GACAAATAC ATAGTTGTTA TGTGGTCTA GATACCAATA CCAATTTGTG ACATGGGCT TGTGCTAAG ATACCAATGA CCGGATACAA ATTATCGGTC TAGTAAAATG

3880 . 3890 . 3900 . 3910 . 3920 . 3930 . 3940 . 3950 . 3960 . 3970 . 3980
 TCTAZAACA TTTTACCACA AATAADAGG TCTCTAGAT ATTTAATATT ATATCTAACA ACAACAATAA AATTTAAGCA TGTATGGCCA GAATGATTTT CTACTAATAA
 AGATATTGTT AAAATGGTGT TATTTATCTT AGGAGATCTA TAAATTAATA TATAGATTGT TGTGTTTTTT TTAATTTGCT ACATACCGGT CTTCAATAAA GATGATTATT

3990 . 4000 . 4010 . 4020 . 4030 . 4040 . 4050 . 4060 . 4070 . 4080 . 4090
 AGATAAGAT AGTCTATCTT ATCTACAGA TATGAAGAA GATTAATCAT TGTAGTAC TACTAATATG GAAAGAAAATG TATACAAAA CTTGGAAGCT TTTTATTAA
 TCTATTCTTA TCGATAGAA TAGATTTCTT ATACTTCTTT CTATAGTAA ATCAATATCG ATGATTTAC CTTTCTTTAC ATATGTTTTT GCACCTTGA AAATATAATT

4100 . 4110 . 4120 . 4130 . 4140 . 4150 . 4160 . 4170 . 4180 . 4190 . 4200
 ATAGCATATT ACTAGAGAT TTAATACTA GACTTAGTAT AACAAACAG TTAATGCA ATATGGATTC TATATTTCAT CATACAGTA GTACATTAAT CMTGATATA
 TATGATATA TGAATCTTA AATTTAGAT CTGAATCATA TGTGTTGTC AATTTAGGCT TATAGCTAAG ATATAAAGTA GTATTGTAT CATGTAATEA GTCACATAT

4210 . 4220 . 4230 . 4240 . 4250 . 4260 . 4270 . 4280 . 4290 . 4300 . 4310
 CTGAAGGAT CTACAGACT AACATGCAA GGAATAAGCA ATATGCAAT TATGCTAAT ATTTTAACTT TAGAACTAAA ACGTTCTACC AATACTAAA ATAGGATAGC
 GACTTTGCTA GATGCTGAG TTGATACGTT CCTTATGCT TATACGGTCA ATACAGATTA TAAAAATGAA ATCTTGATT TTCAAGATGG TATGATTTTT TATCTATGC

4320 . 4330 . 4340 . 4350 . 4360 . 4370 . 4380 . 4390 . 4400 . 4410 . 4420
 TGTATGGCTG TTAAGAGCT CAATTAATAG TAAAGATGA GAAGAATAC TTTGTTCTAT ACCTTGGGAC GAAAGAACTT TAGAACACT TAAGTTTTAT CAACCTGTA
 ACTATCCGAC AATTTCTAC GTTATTATC ATCTTACAT CTCTTTTATG AAACAGATA TGGAAAGCTC CTTTCTTGA ATCTTGTGA ATTCAAATA GTTTGAACAT

4430 .
 TTTATGAGG TACC
 AAATACTTCC ATGG