

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 959 642**

51 Int. Cl.:

C07K 14/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.05.2016 PCT/US2016/032317**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2016 WO16183420**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2016 E 16725323 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2023 EP 3294755**

54 Título: **MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA INDUCIR UNA RESPUESTA INMUNITARIA MEDIANTE CONSTRUCCIONES CON ELEMENTOS CONSERVADOS**

30 Prioridad:

13.05.2015 US 201562161123 P
14.10.2015 US 201562241599 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2024

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (50.0%)
Office of Technology Transfer 6011 Executive
Blvd., Suite 325
Rockville, Maryland 20852, US y
UNIVERSITY OF WASHINGTON (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FELBER, BARBARA K.;
PAVLAKIS, GEORGE N.;
MULLINS, JAMES I.;
VALENTIN, ANTONIO y
MANOCHEEWA, SIRIPHAN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 959 642 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

Métodos y composiciones para inducir una respuesta inmunitaria mediante construcciones con elementos conservados

5

Antecedentes de la invención

La diversidad de secuencias y la inmunodominancia son obstáculos importantes en el diseño de una vacuna eficaz contra el VIH. Se busca una vacuna que pueda inducir respuestas inmunitarias específicas de clados cruzados. Un enfoque para lograr respuestas inmunitarias sólidas entre clados es el uso de vacunas con elementos conservados (CE, del inglés *conserved element*) (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2012/062873 y WO 2013/131099) que pueden servir como una vacuna "universal" porque es capaz de inducir respuestas inmunitarias a la mayoría o a todas las cepas circulantes de un virus. Además, se determinó que se obtuvieron mejores respuestas inmunitarias a las regiones altamente conservadas utilizando una pauta de vacuna primaria y de refuerzo que incluía primovacunación con CE seguido de refuerzo con un vector que expresaba el inmunógeno de longitud completa. Este método condujo a la inducción de respuestas inmunitarias con amplitud alterada y respuestas citotóxicas muy mejoradas (véanse, por ejemplo, Kulkarni, *et al.*, PLoS One;9:e86254, 2014; Kulkarni, *et al.*, PLoS One 9:e111085, 2014; la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 20150056237, y los documentos WO 2012/062873 y WO 2013/131099). La presente invención aborda la necesidad de un protocolo mejorado para inducir una respuesta inmunitaria usando una vacuna con elementos conservados y un antígeno sustancialmente de longitud completa. Además, la invención proporciona una composición inmunógena de elementos conservados de Env del VIH sorprendentemente eficaz que genera una respuesta inmunitaria sólida a las regiones conservadas de las proteínas Env del VIH.

25

Breve resumen de algunas realizaciones de la divulgación

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una mejora de los métodos para inducir una respuesta inmunitaria mediante una composición inmunógena con CE de ácido nucleico, que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican uno o más polipéptidos con CE, donde el método comprende administrar una o más construcciones de ácido nucleico con CE a un paciente como primovacunación, seguido de la administración conjunta del inmunógeno(s) de ácido nucleico con CE con una composición inmunógena que comprende una construcción de ácido nucleico que codifica una forma sustancialmente completa del antígeno del que proceden los CE. El refuerzo mediante la administración conjunta de la(s) composición(es) inmunógena(s) con CE y antígeno de longitud completa, o sustancialmente de longitud completa, mejora las respuestas inmunitarias, por ejemplo, mediante la mejora aún más de los niveles de linfocitos T citotóxicos, lo que centra la respuesta inmunitaria en los epítomos altamente conservados, en comparación con el refuerzo sólo con antígeno de longitud completa.

Por lo tanto, la divulgación proporciona una pauta de inmunización primaria y de refuerzo mejorada que emplea inmunógenos con CE en combinación con inmunógenos de longitud completa que da como resultado una amplitud superior, magnitud y calidad de las respuestas inmunitarias. Esto se logra con una primera administración de composiciones inmunógenas con CE que centran las respuestas inmunitarias en epítomos altamente conservados del virus o un inmunógeno de interés. La etapa de refuerzo se logra mediante la administración conjunta de una vacuna que expresa CE junto con una molécula de longitud completa. Aunque este método puede resultar útil para inducir respuestas inmunitarias a un antígeno del VIH, tal como Gag o Env, el método no se limita al VIH, sino que se puede emplear para mejorar la inducción de respuestas inmunitarias a cualquier epítomo subdominante (celular o humoral) para aumentar la amplitud, magnitud y calidad de las respuestas inmunitarias.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona composiciones de vacunas con elementos conservados (CE) inmunógenas y métodos para utilizar dichas composiciones para inducir una respuesta inmunitaria frente a los polipéptidos de la envoltura del VIH. Una composición inmunógena de la divulgación puede inducir respuestas inmunitarias a la mayoría o a todas las cepas circulantes de VIH. Esta divulgación incluye una descripción de 12 regiones de la envoltura del VIH, que están altamente conservadas en todo el universo conocido de secuencias del grupo M del VIH. La divulgación proporciona polipéptidos con CE que comprenden múltiples CE de las regiones conservadas del VIH. En aspectos habituales, se administran dos polipéptidos con CE que se diferencian entre sí en sólo unos pocos aminoácidos para provocar una respuesta inmunitaria en la mayoría de las cepas del VIH.

En algunos aspectos, una composición inmunógena de la divulgación comprende múltiples secuencias de CE, teniendo cada una una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a 23. En aspectos ilustrativos, las regiones de elementos conservados empleadas en los inmunógenos tienen 11, 14, 21, 15, 23, 21, 13, 12, 14, 43, 20 y 13 aminoácidos de longitud. En aspectos habituales, cada segmento de CE del inmunógeno está separado por enlazadores que facilitan el procesamiento de la proteína.

En algunos aspectos, una composición inmunógena de la divulgación comprende múltiples secuencias de CE que incluyen CE de cada una de las regiones conservadas de Env del VIH, donde cada CE tiene una secuencia que se muestra en la figura 24.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona composiciones inmunógenas que comprenden múltiples elementos

5 CE de Gag del VIH (*por ejemplo*, la figura 23 o los elementos CE de Gag enumerados en la tabla 2) y métodos de uso de dichas composiciones inmunógenas para inducir una respuesta inmunitaria a Gag. Las composiciones inmunógenas con elementos CE de Gag del VIH se pueden administrar con composiciones inmunógenas de Env del VIH como se describe en el presente documento. En dichas realizaciones, las construcciones con CE (construcciones con CE de Gag y Env del VIH) pueden administrarse de forma simultánea o secuencial.

En algunas realizaciones, un polipéptido inmunógeno que comprende elementos conservados de Env comprende además secuencias de la región variable, por ejemplo, una secuencia de la región variable V1V2.

10 Los inmunógenos con elementos conservados normalmente se administran como vacunas de ácido nucleico en las que se administra a un sujeto ADN que comprende una o más secuencias polinucleotídicas que codifican uno o más polipéptidos que comprenden los CE.

15 En algunos casos, los vectores de ADN se genomanipulan para expresar únicamente inmunógenos con CE (polipéptidos con elementos conservados que comprenden múltiples elementos conservados, tales como Env-CE1 y Env-CE2 como se muestra en la figura 10 y como se describe con más detalle en el presente documento), para expresar proteínas Env-CE secretadas que tienen el péptido señal aminoterminal de Env o un péptido señal aminoterminal de GM-CSF, para expresar el polipéptido(s) con CE como una fusión central con la quimiocina proteína 3 quimiotáctica para monocitos (MCP3) para estabilizar la expresión de proteínas y mejorar la secreción de las proteínas, expresar el polipéptido(s) con CE como una fusión con la proteína 1 de membrana asociada a lisosomas (LAMP-1) para dirigir las proteínas al compartimento lisosómico, incluido el acceso a la vía del MHC de clase II, o para dirigir la proteína a la vía de degradación utilizando una secuencia tal como una señal de degradación de β -catenina.

20 Realizaciones ilustrativas de la invención y aspectos de la divulgación incluyen, pero sin limitación, lo siguiente: La presente invención proporciona al menos una construcción de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido con elementos conservados, una segunda construcción de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido con elementos conservados y una construcción de ácido nucleico que codifica una proteína de interés de longitud completa o sustancialmente de longitud completa, para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria a la proteína de interés, en donde la proteína sustancialmente de longitud completa es una región de la proteína que incluye todos los elementos conservados, y el método comprende:

25 provocar una respuesta inmunitaria a la proteína de interés, en donde la provocación comprende administrar; la al menos una construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados, en donde los elementos conservados provienen de la proteína de interés y el polipéptido comprende al menos tres elementos conservados, cada uno de 8 a 50 aminoácidos de longitud donde los elementos conservados están unidos mediante enlaces de origen no natural; y

30 la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados que comprende al menos una variante de un elemento conservado contenido en el primer polipéptido con elementos conservados, en donde la variante en el segundo polipéptido difiere del primer polipéptido en 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, con la condición de que una construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de longitud completa, o una región sustancialmente de longitud completa de la misma, no se administra en la etapa de primovacunación; y

35 reforzar la respuesta inmunitaria a la proteína de interés, en donde el refuerzo comprende administrar conjuntamente (i) la construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de interés de longitud completa, o la proteína de interés sustancialmente de longitud completa, y (ii) la construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados y la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados.

40 En algunas realizaciones, la etapa de refuerzo comprende administrar el ácido nucleico de (i) y el ácido nucleico de (ii) al mismo tiempo.

45 En algunas realizaciones, las construcciones de ácido nucleico se administran por vía intramuscular mediante electroporación *in vivo*.

50 En algunas realizaciones, la primera y segunda construcción de ácido nucleico con elementos conservados se administran de manera secuencial.

55 En algunas realizaciones, la primera y segunda construcción de ácido nucleico con elementos conservados se administran de manera simultánea.

60 En algunas realizaciones, la proteína de interés es Gag del VIH-1 y los elementos conservados son de p24gag del VIH-1.

65 En algunas realizaciones, un polipéptido con elementos conservados comprende al menos 7 elementos conservados de diferentes regiones de p24gag; y cada uno de los elementos conservados tiene una secuencia de elemento conservado que se muestra en la tabla 2.

ES 2 959 642 T3

- En algunas realizaciones, un polipéptido con elementos conservados comprende elementos conservados, cada uno de los cuales tiene una secuencia establecida en las SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31 y 32; y un segundo polipéptido con elementos conservados comprende elementos conservados, cada uno de los cuales tiene una secuencia establecida en las SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37, 38 y 39.
- 5 En algunas realizaciones, un polipéptido con elementos conservados de Gag comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y el segundo polipéptido con elementos conservados de Gag comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41.
- 10 En algunas realizaciones, los polipéptidos con elementos conservados codificados por la primera y segunda construcción de ácido nucleico con elementos conservados de Gag se fusionan cada uno a un péptido señal de GM-CSF.
- 15 En algunas realizaciones, la proteína de interés es una secuencia de Env del VIH-1.
- En algunas realizaciones, un polipéptido con elementos conservados comprende al menos 12 elementos conservados de diferentes regiones conservadas de Env del grupo M del VIH-1 y cada uno de los elementos conservados tiene una secuencia de elemento conservado que se muestra en la tabla 1.
- 20 En algunas realizaciones, un polipéptido con elementos conservados comprende elementos conservados, cada uno de los cuales tiene una secuencia establecida en las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22; y un segundo polipéptido con elementos conservados comprende elementos conservados, cada uno de los cuales tiene una secuencia establecida en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 23.
- 25 En algunas realizaciones, un polipéptido con elementos conservados de Env comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y el segundo polipéptido con elementos conservados de Env comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.
- 30 En algunas realizaciones, los polipéptidos con elementos conservados codificados por la primera y segunda construcción de ácido nucleico con elementos conservados de Env se fusionan cada uno a un péptido señal de GM-CSF.
- 35 En algunas realizaciones, la primera y segunda construcción de ácido nucleico con elementos conservados de ácido nucleico están contenidas en el mismo vector.
- En algunas realizaciones, la primera y segunda construcción de ácido nucleico están contenidas en diferentes vectores.
- 40 En algunas realizaciones, el refuerzo se realiza al menos dos semanas después de la etapa de primovacunación.
- En algunas realizaciones, la etapa de primovacunación comprende dos administraciones de uno o más polipéptidos con elementos conservados, cada una separada por al menos 2 semanas; y la etapa de refuerzo comprende dos administraciones conjuntas, cada una separada por al menos 2 semanas.
- 45 La invención también proporciona un vector de expresión que codifica CE que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 40 fusionada en el extremo N a un péptido señal de GM-CSF humano y una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 41 fusionada en el extremo N de un péptido señal de GM-CSF humano, y un vector de expresión que codifica p55Gag del VIH-1 de longitud completa, o Gag de longitud sustancialmente completa, para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria a Gag del VIH en un
- 50 paciente, comprendiendo el método: provocar una respuesta inmunitaria a Gag del VIH, en donde la provocación comprende administrar al paciente el vector de expresión que codifica CE que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 40 fusionada en el extremo N a un péptido señal de GM-CSF humano y una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 41 fusionada en el extremo N a un péptido señal de GM-CSF humano; y reforzar una respuesta inmunitaria a Gag del VIH, en donde el refuerzo comprende administrar conjuntamente el vector de expresión que codifica CE con el vector de expresión que codifica p55Gag del VIH-1 de
- 55 longitud completa, o Gag de longitud sustancialmente completa.
- En algunas realizaciones, la etapa de refuerzo se realiza aproximadamente dos meses después de la etapa de primovacunación.
- 60 En algunas realizaciones, el método comprende dos etapas de primovacunación, cada una separada por aproximadamente dos meses; y dos etapas de refuerzo, cada una separada por aproximadamente dos meses. En algunas realizaciones, las etapas de primovacunación están separadas por al menos un mes y/o las etapas de refuerzo están separadas por al menos un mes. En algunas realizaciones, las etapas de primovacunación están separadas por
- 65 aproximadamente tres meses y/o las etapas de refuerzo están separadas por aproximadamente tres meses.

- La divulgación también proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria a una proteína de interés, en donde la proteína de interés es Gag del VIH o Env del VIH, comprendiendo el método: provocar una respuesta inmunitaria a la proteína de interés, en donde la provocación comprende administrar al menos una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados, en donde los elementos conservados
- 5 provienen de la proteína de interés y el polipéptido comprende al menos tres elementos conservados, cada uno de 8 a 50 aminoácidos de longitud donde los elementos conservados están unidos mediante enlazadores de origen no natural, con la condición de que una construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de longitud completa, o una región sustancialmente de longitud completa de la misma, no se administra en la etapa de primovacunación; reforzar la respuesta inmunitaria a la proteína de interés, en donde el refuerzo comprende administrar conjuntamente
- 10 (i) una construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de longitud completa, o la proteína sustancialmente de longitud completa, y (ii) la construcción de ácido nucleico que codifica el polipéptido con elementos conservados.
- En algunos casos, la etapa de refuerzo puede comprender administrar el ácido nucleico de (i) y el ácido nucleico de (ii) al mismo tiempo.
- 15 En algunos casos, las construcciones de ácido nucleico pueden administrarse por vía intramuscular mediante electroporación *in vivo*.
- En algunos casos, las etapas de primovacunación y refuerzo pueden comprender además administrar una segunda construcción de ácido nucleico con elementos conservados que codifica un segundo polipéptido con elementos conservados que comprende al menos una variante de un elemento conservado contenido en el primer polipéptido con elementos conservados, en donde la variante en el segundo polipéptido difiere de la variante en el primer polipéptido en 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos.
- 20 En algunos casos, la primera y segunda construcción de ácido nucleico con elementos conservados se pueden administrar de manera secuencial.
- En algunos casos, la primera y segunda construcción de ácido nucleico con elementos conservados se pueden administrar de manera simultánea.
- 30 En algunos casos, la primera y segunda construcción de ácido nucleico con elementos conservados de ácido nucleico pueden estar contenidas en el mismo vector.
- En algunos casos, la primera y segunda construcción de ácido nucleico pueden estar contenidas en diferentes vectores.
- 35 En algunos casos, el refuerzo se puede realizar al menos dos semanas después de la etapa de primovacunación.
- En algunos casos, la etapa de primovacunación puede comprender dos administraciones de uno o más polipéptidos con elementos conservados, cada una separada por al menos 2 semanas; y la etapa de refuerzo comprende dos administraciones conjuntas, cada una separada por al menos 2 semanas.
- 40 La invención también proporciona un vector de expresión que codifica CE que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica p24GagCE1 como se establece en la tabla 2 fusionada en el extremo N a un péptido señal de GM-CSF humano y una secuencia de ácido nucleico que codifica p24GagCE2 como se establece en la tabla 2 fusionada en el extremo N a un péptido señal de GM-CSF humano, y un vector de expresión que codifica p55gag del VIH-1 de longitud completa, o p55gag del VIH-1 de longitud sustancialmente completa, para uso en el método de la invención anterior para inducir una respuesta inmunitaria a Gag del VIH en un sujeto, en donde el método comprende provocar una respuesta inmunitaria a Gag del VIH, en donde la provocación comprende administrar al paciente la expresión que codifica CE; en donde al sujeto no se le administra conjuntamente o no se le ha administrado previamente una construcción de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido Gag del VIH de longitud completa o sustancialmente de longitud completa; y reforzar una respuesta inmunitaria a Gag del VIH, en donde el refuerzo comprende administrar conjuntamente el vector de expresión que codifica CE con el vector de expresión que codifica p55gag del VIH-1 de longitud completa, o p55gag del VIH-1 de longitud sustancialmente completa.
- 50 En algunas realizaciones, la etapa de refuerzo se realiza aproximadamente dos meses después de la etapa de primovacunación.
- En algunas realizaciones, el método comprende dos etapas de primovacunación, cada una separada por aproximadamente dos meses; y dos etapas de refuerzo, cada una separada por aproximadamente dos meses. En algunas realizaciones, las etapas de primovacunación están separadas por al menos un mes y/o las etapas de refuerzo están separadas por al menos un mes. En algunas realizaciones, las etapas de primovacunación están separadas por aproximadamente tres meses y/o las etapas de refuerzo están separadas por aproximadamente tres meses.
- 60 Un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH de la divulgación puede comprender al menos cinco elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID
- 65

NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22; y los elementos conservados están separados por enlazadores de 1 a 5 aminoácidos de longitud.

5 En algunos casos, el polipéptido con elementos conservados de Env del VIH de la divulgación puede comprender al menos seis, siete, ocho, nueve, diez u once elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22

10 Un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH de la divulgación puede comprender los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22.

15 En algunos casos, el polipéptido con elementos conservados de Env del VIH puede comprender además una secuencia de la región variable V1V2.

En algunos casos, el polipéptido con elementos conservados de Env del VIH puede comprender la SEQ ID NO: 24.

20 La divulgación proporciona adicionalmente un ácido nucleico que codifica un polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH, en donde el polipéptido con elementos conservados de Env del VIH comprende al menos cinco elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23; y los elementos conservados están separados por enlazadores de 1 a 5 aminoácidos de longitud.

25 En algunos casos, el polipéptido con elementos conservados de Env del VIH puede comprender al menos seis, siete, ocho, nueve, diez u once elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.

30 En algunos casos, el polipéptido con elementos conservados de Env del VIH puede comprender los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.

En algunos casos, el ácido nucleico puede comprender además una secuencia de la región variable V1V2.

35 En algunos casos, el polipéptido con elementos conservados de Env del VIH puede comprender la SEQ ID NO: 25. El polipéptido con elementos conservados de Env del VIH puede comprender un péptido señal.

En algunos casos, el péptido señal puede ser el péptido señal de GM-CSF.

40 La divulgación también proporciona un polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH que comprende al menos cinco elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22, en donde los elementos conservados están separados por enlazadores de 1 a 5 aminoácidos de longitud.

45 En algunos casos, el polipéptido puede comprender al menos seis, siete, ocho, nueve, diez u once elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22

50 En algunos casos, el polipéptido puede comprender los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22.

55 En algunos casos, el polipéptido puede comprender además una secuencia de la región variable V1V2.

En algunos casos, el polipéptido puede comprender la SEQ ID NO: 24.

60 La divulgación también proporciona un polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH que comprende al menos cinco elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23; en donde los elementos conservados están separados por enlazadores de 1 a 5 aminoácidos de longitud.

65 En algunos casos, el polipéptido puede comprender al menos seis, siete, ocho, nueve, diez u once elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.

En algunos casos, el polipéptido puede comprender los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.

5 En algunos casos, el polipéptido puede comprender además una secuencia de la región variable V1V2.

En algunos casos, el polipéptido puede comprender la SEQ ID NO: 25.

10 La divulgación también proporciona una composición que comprende: un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH que comprende al menos cinco elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22, en donde los elementos conservados están separados por enlazadores de 1 a 5 aminoácidos de longitud; y un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende al menos cinco elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23, en donde los elementos conservados están separados por enlazadores de 1 a 5 aminoácidos de longitud.

20 En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender al menos seis, siete, ocho, nueve, diez u once elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22; y el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender al menos seis, siete, ocho, nueve, diez u once elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.

25 En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22.

30 En algunos casos, el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.

35 En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22; y el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.

40 En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH o el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH; o tanto el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH como el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH pueden comprender además una secuencia de la región variable V1V2.

45 En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

50 En algunos casos, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico pueden estar contenidos en vectores de expresión separados.

55 En algunos casos, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico pueden estar contenidos en el mismo vector de expresión.

60 La divulgación también proporciona una composición que comprende: un primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH que comprende al menos cinco elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22, en donde los elementos conservados están separados por enlazadores de 1 a 5 aminoácidos de longitud; y un segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende al menos cinco elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23, en donde los elementos conservados están

separados por enlazadores de 1 a 5 aminoácidos de longitud.

- 5 En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender al menos seis, siete, ocho, nueve, diez u once elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22; y el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender al menos seis, siete, ocho, nueve, diez u once elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.
- 10 En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22.
- 15 En algunos casos, el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.
- 20 En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22; y el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.
- 25 En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH o el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH; o tanto el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH como el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH pueden comprender además una secuencia de la región variable V1V2.
- 30 En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.
- 35 La divulgación proporciona además un método para inducir una respuesta inmunitaria a Env del VIH, comprendiendo el método administrar un ácido nucleico como se divulga anteriormente a un sujeto o un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH como se divulga anteriormente a un sujeto; o administrar una composición como se divulga anteriormente.
- 40 La divulgación también proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria a Env del VIH, comprendiendo el método administrar: un primer ácido nucleico que codifica un primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH que comprende al menos cinco elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22, en donde los elementos conservados están
- 45 separados por enlazadores de 1 a 5 aminoácidos de longitud; y un segundo ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende al menos cinco elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23, en donde los elementos conservados están separados por enlazadores de 1 a 5 aminoácidos de longitud.
- 50 En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende al menos seis, siete, ocho, nueve, diez u once elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22; y el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende al menos seis, siete, ocho, nueve, diez u once elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.
- 55 En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22.
- 60 En algunos casos, el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.
- 65

- En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22; y el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.
- En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH o el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH; o tanto el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH como el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprenden además una secuencia de la región variable V1V2.
- En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.
- En algunos casos, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico pueden estar contenidos en vectores de expresión separados.
- En algunos casos, el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico pueden estar contenidos en el mismo vector de expresión.
- En algunos casos, el primer y el segundo ácidos nucleicos pueden administrarse de manera secuencial.
- En algunos casos, el primer y segundo ácidos nucleicos pueden administrarse de manera simultánea.
- En algunos casos, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de Env de longitud completa, o un polipéptido de Env de longitud sustancialmente completa, se administra después del primer y segundo ácido nucleico que codifica el primer y segundo polipéptidos con elementos conservados del VIH; o un polipéptido de Env de longitud completa, o un polipéptido de Env sustancialmente de longitud completa, se administra después del primer y segundo ácido nucleico que codifica el primer y segundo polipéptidos con elementos conservados del VIH.
- En algunos casos, las construcciones de ácido nucleico pueden administrarse por vía intramuscular mediante electroporación *in vivo*.
- La divulgación también proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria a Env del VIH, comprendiendo el método administrar: un primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH que comprende al menos cinco elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22, en donde los elementos conservados están separados por enlazadores de 1 a 5 aminoácidos de longitud; y un segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende al menos cinco elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23, en donde los elementos conservados están separados por enlazadores de 1 a 5 aminoácidos de longitud.
- En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende al menos seis, siete, ocho, nueve, diez u once elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22; y el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende al menos seis, siete, ocho, nueve, diez u once elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.
- En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22.
- En algunos casos, el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH puede comprender los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.
- En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22; y el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO:

15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23.

5 En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH o el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH; o tanto el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH como el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprenden además una secuencia de la región variable V1V2.

10 En algunos casos, el primer polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y el segundo polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

En algunos casos, el primer y el segundo polipéptidos inmunógenos con elementos conservados de Env del VIH pueden administrarse de manera secuencial.

15 En algunos casos, el primer y el segundo polipéptidos inmunógenos con elementos conservados de Env del VIH pueden administrarse de manera simultánea.

20 En algunos casos, un polipéptido de Env de longitud completa, o un polipéptido de Env de longitud sustancialmente completa, se administra después del primer y segundo polipéptidos con elementos conservados del VIH; o un polipéptido de Env de longitud completa, o polipéptido de Env sustancialmente de longitud completa, se administra después del primer y segundo ácido nucleico que codifica el primer y segundo polipéptidos con elementos conservados del VIH.

25 La divulgación también proporciona un polipéptido con CE de Gag del VIH que comprende: (a) SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35 y/o SEQ ID NO: 37; o (b) SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36 y/o SEQ ID NO: 38. La divulgación también proporciona una construcción de ácido nucleico que codifica el polipéptido con CE de Gag del VIH.

30 La divulgación proporciona además el polipéptido con CE de Gag del VIH que comprende: P24CE8-1, p24CE9-1, p24CE3-1, p24CE10-1, p24CE5-1, p24CE11-1, p24CE6-1, p24CE12-1, p24CE13-1 como se muestra en la figura 23; o P24CE8-1, p24CE9-2, p24CE3-2, p24CE10-21, p24CE5-2, p24CE11-2, p24CE6-2, p24CE12-2, p24CE13-2 como se muestra en la figura 23. La divulgación también proporciona una construcción de ácido nucleico que codifica el polipéptido con CE de Gag del VIH.

35 En algunos casos, el método para inducir una respuesta inmunitaria a Env del VIH divulgado anteriormente comprende además administrar una composición inmunógena para inducir una respuesta inmunitaria a Gag del VIH, en donde la composición inmunógena es un polipéptido con CE de Gag del VIH que comprende p24 CE1, CE2, CE3, CE4, CE5, CE6 y CE7 como se muestra en la figura 23; o un polipéptido con CE de Gag del VIH divulgado anteriormente. El polipéptido con CE de Gag del VIH se puede administrar como un ácido nucleico.

40 En algunos casos, el método para inducir una respuesta inmunitaria a Env del VIH divulgado anteriormente comprende además administrar una composición inmunógena para inducir una respuesta inmunitaria a Gag del VIH, en donde el método comprende administrar un polipéptido con CE de Gag del VIH que comprende P24CE8-1, p24CE9-1, p24CE3-1, p24CE10-1, p24CE5-1, p24CE11-1, p24CE6-1, p24CE12-1, p24CE13-1 como se muestra en la figura 23, y p24CE8-1, p24CE9-2, p24CE3-2, p24CE10-21, p24CE5-2, p24CE11-2, p24CE6-2, p24CE12-2, p24CE13-2 como se muestra en la figura 23. El polipéptido con CE de Gag del VIH puede administrarse como un ácido nucleico

Breve descripción de los dibujos

50 Figura 1: Procedencia de p27 CE del VIS y conservación relativa a cepas de VIH-1 y VIS de múltiples especies. Todas las secuencias se compararon con p24CE1 del VIH-1, con un "." indicando homología. Las posiciones de alternancia que distinguen p27CE1 y p27CE2 del VIS se muestran en rojo. Las diferencias de aminoácidos que distinguían los CE del VIS y del VIH-1, pero que se conservaban en otras cepas del VIS, se muestran en color azul claro. Se siguió un protocolo que incluía solo un sitio de alternancia por CE, excepto para el CE4, en donde se sustituyeron 2 aminoácidos adicionales ya que esas variantes de aminoácidos siempre se encontraban juntas en la base de datos. No se incluyó ningún aminoácido alternado para p27 CE1, CE6 o CE7 del VIS debido a la conservación extrema observada en esos segmentos entre las secuencias del VIS disponibles. Las secuencias se alinearon según el consenso de las obtenidas de la base de datos del VIH de Los Alamos. Los espacios en blanco indican que las secuencias correspondientes a la región CE estaban disponibles. Se muestran dos secuencias representativas: VISmac (especie de origen: macaco), N = 495; VISmm (mangabey gris), N = 272. Se consideraron secuencias adicionales para la definición de CE, incluidas VISver (mono vervet), N = 3; VISst (mono l'Hoest), N = 4; VISmnd (mandril), N = 3; VISgsn (mono de nariz blanca), N = 2; VISdrl (dril), N = 2; VISden (mono de Dent), N = 1; VISmus (bigotudo), N = 1; VISmon (mona), N = 1; VISdeb (mono de Brazza), N = 2; VISsyk (mono de cuello blanco), N = 1; VISal (talapoín), N = 2; VISsun (de Gabón), N = 1.

65 Figura 2: Respuestas de los linfocitos T específicos de CE en macacos vacunados con ADNp de p27CE. Los

- animales (N = 14) se vacunaron con una mezcla de ADNp de p27CE1 y p27CE2. Las respuestas de los linfocitos T específicos de CE se midieron mediante citometría de flujo intracelular en sangre 2 semanas después de la segunda vacunación. Las PBMC se estimularon con un conjunto de péptidos que abarcaban los CE (15 unidades superpuestas por 11 AA y 10 unidades superpuestas por 9 AA). Los macacos T129 a T152 también se vacunaron con la vacuna de ADNp con CE de Env del VIH al mismo tiempo que se administró la vacuna de ADNp con CE de gag. No se encontraron diferencias en las respuestas celulares inducidas en comparación con los animales (L986 a R684) que solo recibieron la vacuna de ADNp con CE de gag, lo que demuestra la falta de interferencia de las respuestas inmunitarias inducidas por CE de gag y env.
- 5
- 10 **Figura 3:** Evaluación de dos regímenes de vacunación primaria y de refuerzo en macacos. Todos los animales recibieron vacunación primaria con vacuna de ADN de elementos conservados (CE). Se reforzaron los animales con ADN que expresaba el ADN de gag de longitud completa o mediante la administración conjunta de ADN de CE y de gag.
- 15 **Figura 4:** Las respuestas de los linfocitos T provocadas con ADN de CE se refuerzan con una única vacunación con ADN p57gag. Después de recibir la primera vacunación con ADNp de p27CE, los animales recibieron una vacunación de refuerzo heteróloga con el ADNp de p57gag de longitud completa. Las respuestas de los linfocitos T específicos de CE se midieron mediante citometría de flujo intracelular en sangre 2 semanas después de la primovacuna, 2 meses después (día de la vacunación de refuerzo) y 2 semanas después. Las PBMC se estimularon con un conjunto de péptidos que abarcaban los CE (15 unidades superpuestas por 11 AA y 10 unidades superpuestas por 9 AA). Se muestra el aumento de linfocitos T IFN- γ específicos de CE totales tras el refuerzo.
- 20
- 25 **Figura 5:** Aumento de las respuestas de linfocitos T provocadas con CE mediante la administración conjunta de ADN de CE y de gag como vacunación de refuerzo. El % de linfocitos T IFN- γ específicos de CE se midió mediante citometría de flujo después de la primera y segunda vacunación de refuerzo de administración conjunta. Las respuestas específicas de CE se midieron mediante tinción con citocinas intracelular después de la estimulación de PBMC con un conjunto de péptidos específicos de CE que cubría los 7 CE (mezcla de 15 unidades superpuestas por 11 AA y 10 unidades superpuestas por 9 AA). Se muestra el análisis estadístico mediante la prueba de la *t* para datos emparejados.
- 30
- 35 **Figura 6:** La primovacuna con ADN de CE y la administración conjunta de ADN de CE y de gag como refuerzo induce respuestas más amplias. Las respuestas específicas de CE totales se separaron usando subgrupos específicos de grupos de péptidos (mezcla de péptidos de 15 y 10 unidades) para cada CE individual usando PBMC de animales vacunados con ADN de CE (N = 14), animales que recibieron una refuerzo de ADN de gag (N = 6) y animales que recibieron administración conjunta de ADN de CE y de gag como refuerzo.
- 40 **Figura 7:** La administración conjunta de ADN de CE y de gag como refuerzo aumenta los niveles de linfocitos T citotóxicos específicos de CE. Se analizó el contenido de granzima B (GzmB) y la capacidad de desgranulación (CD107a) de los linfocitos T (subconjuntos CD4 y CD8) mediante citometría de flujo. Se muestra el análisis estadístico de los linfocitos T GzmB⁺ CD107a⁺ IFN- γ de los 2 regímenes de vacuna.
- 45 **Figura 8:** A. Esquema del plásmido p24GagCE. B. Esquema del plásmido p55gag.
- 50 En la figura 9 se proporciona un esquema de la localización de regiones conservadas dentro de Env del VIH y la distribución de elementos conservados de la invención dentro de las regiones conservadas.
- 55 En la figura 10 se representan dos polipéptidos inmunógenos con CE de Env, Env-CE1 y Env-CE2 de acuerdo con la invención. Env-CE1 y Env CE2 abarcan 220 aminoácidos. Están muy relacionados y se diferencian en 24 aminoácidos. Las secuencias Env-CE1 y Env-CE2 tienen cada una 282 aminoácidos de longitud, incluidos enlazadores que tienen cada uno una longitud de tres aminoácidos y un péptido señal de 29 aminoácidos.
- 60 En la figura 11 se proporciona un protocolo ilustrativo para la vacunación de macacos con ADN de Env-CE del VIH. Las respuestas inmunitarias específicas de CE en sangre se evaluaron 2 semanas después de V2 (segunda administración de vacuna) y V3 (tercera administración de vacuna) y después de un período de descanso de 3 meses.
- 65 En la figura 12 se proporcionan datos ilustrativos que muestran las respuestas de los linfocitos T de macacos vacunados con ADN. Se incubaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, el inglés *peripheral blood mononuclear cells*) con un conjunto de péptidos que abarcaba los 12 elementos conservados. Se determinó el porcentaje de células CD4 y CD8 específicas de CE que producen IFN- γ tras la estimulación con péptidos. Los resultados muestran la inducción de respuestas tanto de CD4 como de CD8, con un sesgo hacia las respuestas de CD8.
- En la figura 13 se proporcionan datos ilustrativos de que la vacunación con vacunas Env-CE induce respuestas de linfocitos T de memoria. Las PBMC se incubaron con un conjunto de péptidos que abarca los 12 elementos

conservados y se determinó el % de linfocitos T de memoria central CD4 y CD8 productores de IFN- γ específicos de CE (MC; CD28⁺CD95⁺) y de memoria efectora (ME; CD28⁻CD95⁺) después de la estimulación con péptidos.

5 En la figura 14 se proporcionan datos que ilustran que la vacunación con ADN de Env-CE induce respuestas específicas de CE con una fracción significativa de linfocitos T CD8⁺ multifuncionales. Se incubaron PBMC con un conjunto de péptidos que abarcaba los 12 CE y se determinó el % de linfocitos T CD4 y CD8 específicos de CE productores de IFN- γ que albergaban granzima B y que expresan CD107a después de la estimulación con péptidos.

10 En la figura 15 se muestran los resultados del mapeo de respuestas específicas de CE. Esto demostró el reconocimiento de seis de los doce CE en cuatro animales. Se incubaron PBMC con grupos de péptidos individuales que abarcaban los 12 CE y se determinó el % de células CD4 y CD8 específicas de CE que producían IFN- γ después de la estimulación con péptidos. Cada animal reconoció 2 a 4 CE. CE6, CE1, CE10, CE12, CE13 y CE15 no mostraron respuestas celulares en estos animales en este experimento.

15 En la figura 16 se proporcionan datos que ilustran que la vacunación de 9 macacos con ADN que expresa Env de longitud completa no induce respuestas específicas de CE o lo hace de forma deficiente. Se observaron respuestas específicas de Env en todos los animales (utilizando un conjunto de péptidos de la cepa BaL del clado B de Env del VIH que abarca gp120) y se encontraron respuestas específicas de CE en aproximadamente un 55 % de los vacunados. Las respuestas específicas de CE mostraron una amplitud estrecha (0 a 2 CE/animal) en comparación con la vacuna Env-CE del VIH (2 a 4 CE/animal; tasa de respuesta del 100 %).

20 En la figura 17 se ilustra un protocolo de vacunación primaria y de refuerzo utilizando ADN de env-CE del VIH como primovacunación y ADN de env como refuerzo. El refuerzo fue una mezcla de ADN de env compuesta de ADN de env de BaL y 6101 del clado B y 1086 del clado C que cubría las 24 secuencias de CE presentes en las proteínas Env CE1 y CE2 del VIH. La molécula Env inalterada producida (gp145) carece del bucle inmunodominante en la porción extracelular de gp41. Se incluyó ADN de IL-12 de macaco en la mezcla de vacuna. El ADN se administró mediante inyección intramuscular seguida de electroporación *in vivo*.

25 En la figura 18 se proporcionan datos que ilustran que las respuestas provocadas por el ADN de env-CE (CE1 y CE2) se refuerzan tras la vacunación con Env inalterada. Los resultados muestran que las respuestas específicas de CE aumentaron significativamente con un primer refuerzo con ADN de env de gp145 y se aumentaron aún más con un 2^o refuerzo. En cambio, la vacunación con ADN de env sólo indujo respuestas específicas de CE escasas o nulas. La primovacunación con ADN de env-CE seguido de un refuerzo con ADN que codifica Env inalterado es una pauta eficaz para aumentar la amplitud y la magnitud de las respuestas específicas de Env, incluidas las respuestas de linfocitos T de memoria y citotóxicos.

30 En la figura 19 se muestra una comparación de las respuestas a CE individuales antes y después del refuerzo con plásmidos de ADN que expresan Env inalterada. El análisis muestra que tras el refuerzo, 7 de los 12 segmentos (58 %) de Env-CE del VIH son inmunógenos.

35 En la figura 20 se muestran datos que ilustran que una vacuna de ADN de env-CE indujo anticuerpos que pueden reconocer Env de gp120 mediante ELISA (VIH-1 IIIB). En este experimento, se analizaron diluciones seriadas de plasma de animales vacunados utilizando un ensayo ELISA de VIH-1 IIIB. Los resultados muestran que uno de los animales (P574) desarrolló una respuesta de unión de anticuerpos a gp120 después de la primovacunación con CE (22 semanas después de la tercera vacunación, V3wk2). Se reforzaron las respuestas mediante cada una de la cuarta y la quinta vacunas de ADN de env de longitud completa (cuarta y quinta vacunación V4wk2, V5wk2). Los animales L985, R288 y RO67 desarrollaron respuestas de anticuerpos ELISA solo después de la vacunación de refuerzo (4^a y 5^a vacunación).

40 En la figura 13 se muestran los resultados de un análisis de inmunotransferencia Western de respuestas inmunitarias humorales. Las proteínas de las células transfectadas con ADN de env-CE1 del VIH o ADN de env-CE2 del VIH se separaron en geles desnaturalizantes y se transfirieron a membranas. Se incubaron tiras individuales de membranas con plasma (dilución 1:100) de los macacos vacunados y se visualizaron utilizando la metodología de transferencia Western convencional. Los resultados muestran que los cuatro macacos inmunizados con ADN env-CE del VIH desarrollaron respuestas de anticuerpos a los inmunógenos. Env-CE2 se reconoció mejor, probablemente porque se cargaron de manera efectiva niveles más elevados de esta proteína porque la proteína es ligeramente más estable que Env-CE1. Los anticuerpos que reconocen el inmunógeno con CE están reforzados en animales los L985, R288 y en menor medida en P574 y RO67.

45 En la figura 22 se proporcionan datos que ilustran que los anticuerpos inducidos por la vacuna Env-CE del VIH reconocían proteínas Env del VIH inalteradas tanto del clado B como del clado C. La proteína gp145 de las células transfectadas se separó en geles desnaturalizantes y se transfirió a membranas. Las membranas se incubaron con plasma de macacos primovacunados con ADN de env-CE y reforzado con ADN de env inalterado. Las proteínas de células transfectadas de manera simulada sirvieron como control negativo.

En la figura 23 se muestran secuencias de p24CE de Gag del VIH. El término CE "inicial" en la figura 15 se refiere a las secuencias de CE de Gagp24 del VIH descritas en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 20150056237. En el presente documento se describen secuencias de CE "alternativas".

5 En la figura 24 se muestran secuencias adicionales de CE de Env del VIH.

En la figura 25 se muestra un polipéptido con CE de Env del VIH ilustrativo (Env-CE1_v1V2 BaL) que comprende una secuencia V1V2.

10 Descripción detallada de la invención

Terminología

15 Una "región conservada", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una secuencia proteica que se conserva en una proteína que tiene una gran diversidad de secuencias en la naturaleza, por ejemplo, una proteína vírica, tal como Env del VIH o Gag del VIH. Una "región conservada" no necesita tener una identidad de secuencia del 100 % en toda la diversidad de secuencias de origen natural de la proteína, pero la variabilidad de la secuencia de aminoácidos en las secuencias de origen natural de la región conservada es baja, normalmente del 10 % o menos. Un "elemento conservado", en el contexto de la presente divulgación, es un segmento de una región conservada que 20 tiene al menos 8 aminoácidos, o más, de longitud. En algunos aspectos de la divulgación, un "elemento conservado" tiene más de 8 aminoácidos de longitud, por ejemplo, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 o más aminoácidos de longitud. Normalmente, un elemento conservado tiene menos de 50 aminoácidos de longitud. No es necesario que un "elemento conservado" esté 100 % conservado en toda la diversidad de secuencias del VIH, por ejemplo, secuencias Gag del 25 VIH o secuencias Env del VIH. La variabilidad de la secuencia en la secuencia del elemento conservado de origen natural es baja, sin embargo, normalmente del 10 % o menos.

En el contexto de la presente invención, un "par de elementos conservados" en lo que se refiere a una composición inmunógena de elementos conservados, por ejemplo, elementos conservados de Gag del VIH o Env del VIH, se refiere 30 a dos versiones de una secuencia de elementos conservados que tienen cambios de aminoácidos entre sí de modo que las dos secuencias juntas cubren al menos un 90 % de las secuencias de origen natural. Por ejemplo, un "par de elementos conservados" de Env del VIH se refiere a dos versiones de una secuencia de elementos conservados que tienen cambios de aminoácidos entre sí de modo que las dos secuencias juntas cubren al menos un 90 % de las variantes de Env del VIH que se producen de forma natural y que pertenecen al grupo M del VIH-1.

35 Un elemento de "región variable", en el contexto de Env del VIH, es una secuencia de una región variable de Env del VIH, por ejemplo, la región V1V2, que también puede incluirse en un polipéptido inmunógeno con CE de Env del VIH si el reconocimiento de esta región se asocia con cargas víricas más bajas en estudios publicados o si se sabe que las sustituciones de aminoácidos en esa región disminuyen la capacidad de replicación vírica, o si el reconocimiento 40 de la región se ha asociado con la eficacia de la vacuna, o si las sustituciones de aminoácidos en esa región están asociadas con cambios en la estabilidad proteica prevista.

45 Una "vacuna de ácido nucleico", como se utiliza en el presente documento, incluye tanto vacunas de ADN no marcado, por ejemplo, vacuna plasmídica, como vacunas de ácido nucleico basadas en vectores víricos que están compuestas por un vector vírico y/o administradas como partículas víricas.

La expresión "ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma tanto monocatenaria como bicatenaria. La expresión abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos o enlaces modificados de la cadena principal, que son sintéticos, de origen natural y de origen no 50 natural, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de forma similar a los nucleótidos de referencia. A menos que se indique de otro modo, una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente variantes modificadas conservativamente de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Las sustituciones de codones degenerados pueden lograrse mediante la generación de secuencias en las 55 cuales la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con restos de base mixta y/o de desoxiinosina (Batzner *et al.*, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini *et al.*, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). La expresión "ácido nucleico" se utiliza indistintamente con gen, ADNc, oligonucleótido y polinucleótido. Un "ácido nucleico" abarca tanto ARN como ADN.

60 Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos o nucleótidos que es igual (por ejemplo, aproximadamente un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o más de identidad en una región específica (por ejemplo, una secuencia polipeptídica que comprende elementos conservados colineales), cuando se 65 compara y alinea para obtener la máxima correspondencia en una ventana de comparación o región designada) medido utilizando algoritmos de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con parámetros predeterminados

(véase, por ejemplo, el sitio web del NCBI o similar), o mediante alineación manual e inspección visual. En la presente invención, en el contexto de la comparación de una secuencia de elemento conservado particular con una variante de esa secuencia, la identidad se define a lo largo de la longitud de la secuencia de referencia del elemento conservado. En algunas realizaciones, el porcentaje de identidad de un elemento conservado con una variante correspondiente del elemento conservado se determina mediante inspección visual.

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

Los aminoácidos se pueden citar en el presente documento bien por sus símbolos habitualmente conocidos de tres letras o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura bioquímica de la IUPAC-IUB. Los nucleótidos, asimismo, se pueden citar por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

El término "mamífero" se refiere a cualquier animal dentro de la clasificación taxonómica mammalia. Un "mamífero" se puede referir a un ser humano o a un primate no humano. Un "mamífero" también se puede referir a un animal doméstico, incluido, por ejemplo, canino, felino, rodentia, incluido lagomorfo, murino, rattus, Cricetinae (hámsteres), etc. Un mamífero se puede referir a un animal agrícola, incluido, por ejemplo, bovino, ovino, porcino, equino, etc.

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

Un "inmunógeno" se refiere a una molécula, normalmente una molécula proteica en la presente invención, que contiene uno o más epítopos (ya sea lineal, conformacional o ambos) que estimularán el sistema inmunitario de un hospedador para generar una respuesta humoral y/o celular específica de antígeno. Normalmente, un epítipo comprenderá entre aproximadamente 7 y 15 aminoácidos, tal como, 9, 10, 12 o 15 aminoácidos. El término "inmunógeno" incluye inmunógenos aislados así como organismos inactivados, tales como virus.

En la presente descripción, cualquier intervalo de concentraciones, intervalo de porcentajes, intervalo de relaciones o intervalo de números enteros se entiende que incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo citado y, cuando sea adecuado, fracciones del mismo (tal como una décima y una centésima de un número entero), a menos que se indique de otra manera. Como se utiliza en el presente documento, "aproximadamente" significa $\pm 10\%$ del intervalo, valor, secuencia o estructura indicado, a menos que se indique de otra manera. Debe entenderse que los términos "un" y "uno/a", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a "uno o más" de los componentes enumerados a menos que su contexto indique o dicte otra cosa. El uso de la alternativa (por ejemplo, "o") debe entenderse que significa una u otra, ambas o cualquier combinación de las alternativas a menos que se indique de otra manera.

Aspectos de la divulgación

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la administración de uno o más polipéptidos que comprenden elementos conservados, separados por enlazadores de origen no natural y dispuestos colinealmente, de un inmunógeno de interés, por ejemplo, un antígeno vírico, tal como Gag del VIH o Env del VIH, puede proporcionar una respuesta inmunitaria mejorada cuando una o más construcciones de ácido nucleico con elementos conservados se administran a un sujeto como primovacunación seguida de la administración conjunta al sujeto de una construcción de ácido nucleico que codifica un antígeno de longitud completa, o sustancialmente un antígeno de longitud completa, con la construcción o construcciones con elementos conservados como refuerzo. Los componentes de un protocolo de inmunización primaria y de refuerzo de acuerdo con la invención se administran como ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos. En algunos aspectos de la divulgación, los componentes de la inmunización primaria y/o de refuerzo se administran como polipéptidos.

El inmunógeno puede ser cualquier proteína para la que se desee inducir una respuesta inmunitaria, pero suele ser una proteína vírica que muestra diversidad de secuencias en variantes de origen natural. En algunas realizaciones, la proteína vírica es una proteína retrovírica, tal como una proteína lentivírica. En algunas realizaciones, la proteína vírica es una proteína retrovírica Gag o Env, tal como una proteína Gag del VIH o Env del VIH.

La invención se basa además, en parte, en el descubrimiento de que la administración de uno o más polipéptidos que comprenden elementos conservados, separados por enlazadores y dispuestos colinealmente de proteínas con elementos conservados de Env del VIH como se describe en el presente documento puede proporcionar una respuesta inmunitaria sólida en comparación con la administración de una proteína Env de longitud completa a un sujeto. En algunos aspectos, la divulgación proporciona así polipéptidos con elementos conservados de Env del VIH, ácidos

nucleicos que codifican polipéptidos con elementos conservados de Env del VIH y métodos para utilizar dichos polipéptidos y ácidos nucleicos para inducir una respuesta inmunitaria.

Composiciones inmunógenas con elementos conservados de Env del VIH.

5 En un aspecto, la divulgación proporciona composiciones con elementos conservados de Env del VIH. En la invención, se administra una composición con elementos conservados de Env del VIH en forma de una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH. Como alternativa, en algunos aspectos de la divulgación, la composición inmunógena con elementos conservados de Env del VIH se puede administrar en forma de polipéptido. Por consiguiente, la divulgación proporciona polipéptidos inmunógenos con elementos conservados de Env del VIH y construcciones de ácido nucleico que codifican estos polipéptidos.

15 Una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH normalmente codifica un polipéptido que comprende al menos seis de los elementos conservados expuestos en las SEQ ID NO: 1 a 23 y 70 a 85. La construcción de ácido nucleico puede codificar un polipéptido que comprende al menos 8, normalmente al menos 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 o más aminoácidos consecutivos de los elementos conservados de las SEQ ID NO: 1 a 23 y 70 a 85.

20 En algunas realizaciones, una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH codifica un polipéptido que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o los doce elementos conservados establecidos en las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 22. En algunas realizaciones, una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH codifica un polipéptido que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o los doce elementos conservados establecidos en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 o 23.

25 En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 8, normalmente al menos 9, 10 u 11 aminoácidos consecutivos de CE6 (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 10, normalmente al menos 11, 12, 13 o 14 aminoácidos consecutivos de CE1 (SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 15, normalmente al menos 16, 17, 18, 19, 20 o 21 aminoácidos consecutivos de CE7 (SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 10, normalmente al menos 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos consecutivos de CE8 (SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 15, normalmente al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 aminoácidos consecutivos de CE9 (SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 15, normalmente al menos 16, 17, 18, 19, 20 o 21 aminoácidos consecutivos de CE10 (SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 8, normalmente al menos 9, 10, 11, 12 o 13 aminoácidos consecutivos de CE11 (SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 8, normalmente al menos 9, 10, 11 o 12 aminoácidos consecutivos de CE12 (SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 9, normalmente al menos 10, 11, 12, 13 o 14 aminoácidos consecutivos de CE13 (SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 20, y normalmente al menos 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 o 43 aminoácidos consecutivos de CE4 (SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 15, normalmente al menos 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos consecutivos de CE15 (SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 21). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 8, normalmente al menos 9, 10, 11, 12 o 13 aminoácidos consecutivos de CE16 (SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 23).

50 En algunas realizaciones, un polipéptido con CE de Env del VIH puede comprender un CE establecido en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 70 a 85. En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 10, normalmente al menos 11, 12, 13, 14, 15 o 16 aminoácidos consecutivos de EnvCE17 (SEQ ID NO: 70 o SEQ ID NO: 71). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 aminoácidos consecutivos de CE18 (SEQ ID NO: 72 o SEQ ID NO: 73). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 15, normalmente al menos 16, 17, 18 o 19 aminoácidos consecutivos de CE19 (SEQ ID NO: 74 o SEQ ID NO: 75). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 8, 9 o 10 aminoácidos consecutivos de CE20 (SEQ ID NO: 76 o SEQ ID NO: 77). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 14, normalmente al menos 15, 16 o 17 aminoácidos consecutivos de CE21 (SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 79). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 25, normalmente al menos 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 aminoácidos consecutivos de CE22 (SEQ ID NO: 80 o SEQ ID NO: 81). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 12, normalmente al menos 13, 14 o 15 aminoácidos consecutivos de CE23 (SEQ ID NO: 82 o SEQ ID NO: 83). En algunas realizaciones, una secuencia de elementos conservados tiene al menos 15, normalmente al menos 16, 17, 19 o 19 aminoácidos consecutivos de CE24 (SEQ ID NO: 84 o SEQ ID NO: 85).

65 En algunas realizaciones, un polipéptido con CE de Env del VIH comprende las doce secuencias de elementos conservados de Env del VIH CE6, CE1, CE7, CE8, CE9, CE10, CE11, CE12, CD13, CE14, CE15 y CE16, en este

orden o en cualquier otro orden. En algunas realizaciones, un polipéptido con CE de Env del VIH puede comprender además la secuencia de elementos conservados de Env del VIH CE20 y/o CE23. En algunas realizaciones, un polipéptido con CE de Env del VIH comprende CE17, CE18, CE19, CE21, CE22 y/o CE24 en sustitución de CE8, CE9, CE10, CE11, CE14 y/o CE15, respectivamente.

5 En algunas realizaciones, un polipéptido con CE de Env del VIH comprende elementos conservados de Env CE6, CE1, CE7, CE17, CE18, CE19, CE20, CE21, CE12, CE13, CE22, CE23, CE24 y CE16.

10 En algunas realizaciones, un polipéptido con CE de Env del VIH tiene al menos un 90 %, o al menos un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 25. En algunas realizaciones, el polipéptido con CE de Env del VIH tiene al menos un 90 %, o al menos un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad con la secuencia del polipéptido Env-CE1-V1V2 Bal mostrada en la figura 25 (SEQ ID NO: 69).

15 En la presente divulgación, los elementos conservados de Env del VIH contenidos en los polipéptidos con elementos conservados no son contiguos en la secuencia de la proteína Env nativa. Además, los elementos conservados presentes en un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH están separados por secuencias polipeptídicas que no se dan de forma natural en las secuencias de proteínas nativas. Los elementos conservados individuales normalmente se unen entre sí en la construcción de ácido nucleico mediante un enlazador peptídico, tal como un enlazador que contiene alanina. Las secuencias del enlazador peptídico contienen Ala y también pueden incluir otros aminoácidos tales como Gly, Val, Glu, Asp, Lys o Phe. La secuencia enlazadora puede variar en longitud, por ejemplo, de 1 a 5 aminoácidos de longitud, o incluso más, pero normalmente no tiene más de 6, 7 u 8 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia enlazadora tiene una longitud de 3 aminoácidos. En algunas realizaciones, la secuencia enlazadora es AAV, AAE, GAK, AAD, AAK, GAV, VAV o AAF.

25 Los elementos conservados pueden estar presentes en cualquier orden en la construcción, no es necesario que se produzcan en el orden de la secuencia natural. Por ejemplo, un elemento conservado que se produce hacia el extremo N de una proteína puede codificarse en el extremo carboxiterminal de la construcción.

30 En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH codifica un polipéptido que comprende al menos cinco o más, o al menos seis, siete, ocho, nueve, diez u once de los elementos conservados establecidos en las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 22. En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH codifica un polipéptido que comprende los doce elementos conservados establecidos en las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22. En algunas realizaciones, dicha construcción de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24. En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH codifica un polipéptido que comprende al menos cinco o más, o al menos seis, siete, ocho, nueve, diez u once de los elementos conservados establecidos en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 o 23. En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH codifica un polipéptido que comprende los doce elementos conservados establecidos en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 23. En algunas realizaciones, dicha construcción de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. En algunas realizaciones, se administra una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 24 junto con una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID NO: 25.

45 En algunas realizaciones, un polipéptido con CE de Env del VIH que comprende elementos conservados de Env de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 22 se administra junto con un polipéptido con CE de Env del VIH que comprende las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85 y SEQ ID NO: 23.

50 En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH codifica un polipéptido que difiere de la SEQ ID NO: 24 en no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos. En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH codifica un polipéptido que difiere de la SEQ ID NO: 25 en no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos.

55 En algunas realizaciones, un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH comprende además una o más secuencias de una región variable de Env del VIH, por ejemplo, la región V1V2. Las secuencias de la región variable son bien conocidas en la materia y están unidas por restos de cisteína.

60 En la presente divulgación, una construcción de ácido nucleico con elementos conservados de Env del VIH como se describe en el presente documento se emplea normalmente en una pauta de vacunación que también emplea un ácido nucleico que codifica la proteína Env de longitud completa, o la proteína Env sustancialmente de longitud completa, de donde se obtienen los elementos conservados. En el contexto de la presente invención, "sustancialmente de

65

longitud completa" se refiere a la región de la proteína Env que incluye todos los elementos conservados, es decir, se proporciona una longitud suficiente de una proteína Env de origen natural que incluye todos los elementos conservados que se utilizan en la construcción con elementos conservados.

5 Pautas de administración

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona una pauta de administración mejorada para composiciones inmunógenas con elementos conservados que proporciona una respuesta inmunitaria sólida. Por lo tanto, la divulgación proporciona adicionalmente un método para inducir una respuesta inmunitaria, donde el método comprende administrar una o más construcciones de ácido nucleico que codifican un polipéptido con elementos conservados, seguido de la administración de una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido de longitud completa o sustancialmente de longitud completa, donde la construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido de longitud completa o sustancialmente de longitud completa se administra junto con la construcción de ácido nucleico que codifica el polipéptido con elementos conservados.

En algunas realizaciones, las composiciones inmunógenas empleadas en las pautas de administración mejoradas como se describen en esta sección se relacionan con una proteína vírica, por ejemplo, una proteína de retrovírica, tal como Gag. En el presente documento se describen elementos conservados ilustrativos de Gag. Véanse, también por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20110269937; Rolland *et al.*, PLoS Pathog 3: e157, 2007; Mothe *et al.*, PLoS One 7: e29717, 2012; y el documento US20150056237.

Cada elemento conservado incluido en un polipéptido con CE de acuerdo con los métodos mejorados para generar una respuesta inmunitaria de la divulgación tiene generalmente 50 aminoácidos o menos de longitud, pero tiene al menos 8 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el elemento conservado tiene al menos 8 aminoácidos de longitud y 45, 40, 35, 30, 25, 20 o 15 aminoácidos de longitud, o menos. En algunas realizaciones, el elemento conservado tiene 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 aminoácidos de longitud.

En la invención, se utiliza más de una construcción de ácido nucleico que codifica los elementos conservados de interés, donde una construcción codifica un primer conjunto de elementos conservados, por ejemplo, de Gag de VIH o de Env del VIH, y la segunda construcción codifica un segundo conjunto de elementos conservados donde uno o más elementos, a menudo la mayoría o todos los elementos conservados, del segundo conjunto de elementos conservados difieren del primer conjunto en 5 aminoácidos o menos. Es decir, un elemento conservado presente en los dos conjuntos contiene un número limitado de sustituciones (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) en relación con el elemento conservado correspondiente. Sin embargo, los restos en los que difieren las secuencias se encuentran en lugares de variación natural en las secuencias proteicas naturales, de modo que cada uno de los elementos conservados en el primer y segundo conjuntos corresponde a una secuencia proteica de origen natural. En algunas realizaciones, cada elemento del segundo conjunto es al menos un 80 % o al menos un 90 % idéntico al elemento correspondiente en el primer conjunto de secuencias conservadas. La construcción de ácido nucleico que codifica el primer conjunto de elementos conservados y la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo conjunto de elementos conservados pueden estar presentes en el mismo vector o en vectores diferentes.

Como se explicó anteriormente con respecto a las construcciones con elementos conservados de Env del VIH, en los métodos mejorados para generar una respuesta inmunitaria como se describe en el presente documento, los elementos conservados contenidos en los polipéptidos con elementos conservados no son contiguos en la secuencia proteica de origen natural. Además, los elementos conservados presentes en un polipéptido con elementos conservados generado de acuerdo con la invención están separados por secuencias polipeptídicas que no se encuentran naturalmente en la secuencia proteica. Los elementos conservados individuales normalmente se unen entre sí en la construcción de ácido nucleico mediante un enlazador peptídico, tal como un enlazador que contiene alanina. Las secuencias enlazadoras se conocen bien en la materia. Las secuencias enlazadoras peptídicas típicas contienen Ala y también pueden incluir otros aminoácidos, tales como Gly, Val, Glu, Asp, Lys o Phe. La secuencia enlazadora puede variar en longitud, por ejemplo, de 1 a 5 aminoácidos, o incluso más, de longitud, pero normalmente no tiene más de 6, 7 u 8 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia enlazadora tiene una longitud de 3, 4 o 5 aminoácidos. En algunas realizaciones, la secuencia enlazadora es AAV, AAE, GAK, AAD, AAK, GAV, VAV o AAF. En algunas realizaciones, el enlazador es AA, AAEE, AAAA, AAK, AG, AA, LAK, AAK, AAAAL y similares.

Los elementos conservados pueden estar presentes en cualquier orden en la construcción, no es necesario que se produzcan en el orden de la secuencia natural. Por ejemplo, un elemento conservado que se produce hacia el extremo N de una proteína puede codificarse en el extremo carboxiterminal de la construcción.

En algunas realizaciones, la proteína de interés es Gag del VIH. Una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados para su uso en la invención puede codificar un polipéptido que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete elementos conservados establecidos en la tabla 2. En algunas realizaciones, la construcción de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende al menos 8, normalmente al menos 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos consecutivos de un elemento conservado establecido en la tabla 2. Véase también, por ejemplo, el documento US20150056237, que enseña elementos

conservados de Gag del VIH. En algunas realizaciones, un polipéptido con CE de Gag utilizado de acuerdo con los métodos comprende un polipéptido con CE p24Gag que tiene la secuencia del polipéptido p24GagCE1 de la tabla 2:

VIPMFSALSEGATPQDLNAAVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAG
 TTSTLQEIQGWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQAAGLEEM
 MTACQGVGGPGHKA AISPRTLNAWVKV (SEQ ID NO:40).

5 En algunas realizaciones, un polipéptido con CE de Gag utilizado de acuerdo con los métodos comprende un polipéptido con CE p24Gag que tiene la secuencia del polipéptido p24GagCE2 de la tabla 2:

VIPMFTALSEGATPQDLNAAVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAG
 TTSTLQEQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYSVPSIAAKYVDRFFKTLRAEQAAGLEEM
 MTACQGVGGPSHKAALSPRTLNAWVKV (SEQ ID NO:41).

10 En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados de Gag del VIH para su uso en la invención codifica un polipéptido que comprende los elementos conservados establecidos en la tabla 2 de SEQ ID NO: 26 a 32. En algunas realizaciones, dicha construcción de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de p24GagCE1 como se muestra en la tabla 2. En algunas realizaciones, un
 15 ácido nucleico que codifica un elemento conservado codifica un polipéptido que comprende los elementos conservados establecidos en las SEQ ID NO: 33 a 39. En algunas realizaciones, dicha construcción de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de p24GagCE2 como se muestra en la tabla 2. En algunas realizaciones, una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende las
 20 secuencias de p24GagCE1 de SEQ ID NO: 26 a 32 expuestas en la tabla 2 se administra con una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende las secuencias de p24GagCE2 de las SEQ ID NO: 33 a 39 expuestas en la tabla 2. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que codifica p24gagCE1 está presente en el mismo vector que la secuencia de ácido nucleico que codifica p24gagCE2.

25 En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica p24GagCE1 como se establece en la tabla 2 se administra conjuntamente con un ácido nucleico que codifica p24GagCE2 como se establece en la tabla 2, donde cada uno de los polipéptidos p24GagCE1 y p24GagCE2 se expresa como una proteína de fusión que tiene un péptido señal de GM-CSF humano en el extremo N.

30 En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados de Gag codifica al menos un elemento conservado establecido en las secuencias de CE alternativas mostradas en la tabla 2.

35 En algunas realizaciones, un inmunógeno de interés es Env del VIH. En algunas realizaciones, una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH empleada de acuerdo con la invención normalmente codifica un polipéptido que comprende un elemento conservado como se describe en el presente documento. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la construcción de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende al menos 8, normalmente al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35 o más
 40 aminoácidos consecutivos de los elementos conservados de Env mostrados en la tabla 1. En algunas realizaciones, un polipéptido con CE de Env utilizado de acuerdo con la invención comprende un polipéptido EnvCE1 que comprende 12 elementos conservados: CE6, CE1-1, CE7-1, CE8-1, CE9-1, CE10-1, CE11-1, CE12-1, CE13-1, CE14-1, CE15-1 y CE16-1 como se muestra en la tabla 1. En algunas realizaciones, el polipéptido Env CE1 comprende la secuencia del polipéptido Env CE1 de la tabla 1 (los enlazadores están subrayados):

WVTVYYGVPVWAAVHNWATHACVPTDPAAEISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLGA
KFEPIPHYCTPAGFAGAKVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEAADSGGDPEIVMHSFN
 CGGEFFYCGAKDNWRSELYKYKVAAKARRRVVQREKRAGAVGFLGTAGSTMGA
ASVAVLTVQARLLLSGIVQQNNLLRAIEAQHLLQLTVWGIKQLQARAADWLWYI
 KIFIMIVGGLVGLRIAAFRVVRKGYSPSLQT.

45 En algunas realizaciones, un polipéptido Env CE utilizado de acuerdo con los métodos comprende un polipéptido Env CE2 que comprende 12 elementos conservados: CE6, CE1-2, CE7-2, CE8-2, CE9-2, CE10-2, CE11-2, CE12-2, CE13-2, CE14-2, CE15-2 y CE16-2 como se muestra en la tabla 1. En algunas realizaciones, el polipéptido Env CE2 comprende la secuencia del polipéptido Env CE2 de la tabla 1 (los enlazadores están subrayados):

WVTVYYGVPVWAAVHNIWATHACVPTDPAAEISLWDESLKPCVKLTPLCVTLGAK
 FDPPIHYCAPAGYAGAKVQCTHGIKPVVSTQLLLNGSLAEAADAGGDLEITTHSFNC
 RGEFFYCGAKNNWRSELYKYKVVAAKAKRRVVEREKRAGAVGFLGAAGSTMGAA
 SYAVLTVQARQLLSGIVQQSNLLKAIEAQHMLQLTVWGIKQLQTRAADWLWYIR
 IFIMIVGGLIGLRIA~~AF~~FRV~~R~~QGYSP~~S~~LFQT.

- 5 En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH para su uso de acuerdo con la divulgación codifica un polipéptido que comprende los doce elementos conservados establecidos en las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22. En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH de acuerdo con la divulgación codifica un polipéptido que comprende los doce elementos conservados establecidos en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 23.
- 10 En algunas realizaciones, un polipéptido con CE de Env del VIH que comprende elementos conservados de Env de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53 y SEQ ID NO: 22 se administra junto con un polipéptido con CE de Env del VIH que comprende las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 23.
- 15 En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH codifica un polipéptido que difiere de la SEQ ID NO: 24 en no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos. En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados de Env del VIH codifica un polipéptido que difiere de la SEQ ID NO: 25 en no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos.
- 20 Se puede administrar una construcción con elementos conservados de Env del VIH junto con construcciones inmunógenas para inducir una respuesta inmunitaria a regiones adicionales del VIH, por ejemplo, Gag o una proteína no estructural tal como Nef. En realizaciones típicas, las composiciones inmunógenas adicionales codifican polipéptidos con elementos conservados para la proteína del VIH de interés, por ejemplo, Gag.
- 25 En algunos aspectos, la divulgación proporciona además elementos conservados de Gag además de los descritos anteriormente para su uso en composiciones inmunógenas con CE. En algunas realizaciones, un polipéptido con CE de Gag del VIH comprende un CE como se establece a continuación:
- 30

| | |
|-----------|--|
| p24CE8-1 | QPISPRTLNAWVKV (SEQ ID NO: 57) |
| p24CE8-2 | QALSPRTLNAWVKV (SEQ ID NO: 58) |
| p24CE9-1 | EEKAFSPEVIPMFSALSEGATPQDLNTMLN (SEQ ID NO: 59) |
| p24CE9-2 | EEKGFNPEVIPMFTALSEGATPQDLNMMLN (SEQ ID NO: 60) |
| p24CE10-1 | PRGSDIAGTTSTLQEIQWMT (SEQ ID NO: 61) |
| p24CE10-2 | PRGSDIAGTTSTLQEIQAWMT (SEQ ID NO: 62) |
| p24CE11-1 | SILDIRQGPKPEFRDYVDRF (SEQ ID NO: 63) |
| p24CE11-2 | SILDIKQGPKPEFRDYVDRF (SEQ ID NO: 64) |
| p24CE12-1 | QNSNPDCCKTILKALG (SEQ ID NO: 65) |
| p24CE12-2 | QANPDCCKTILKALG (SEQ ID NO: 66) |
| p24CE13-1 | LEEMMTACQGVGGPGHKARILAEAM (SEQ ID NO: 67) |
| p24CE13-2 | LEEMMTACQGVGGPSHKARVLAEAM (SEQ ID NO: 68) |

Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona un polipéptido con CE de Gag del VIH que comprende uno o más, o dos, o tres, o cuatro, o cinco, o todos los CE de SEQ ID NO: 57, 59, 61, 63, 65 o 67; o uno o más, o dos, o tres, o cuatro, o cinco, o todos los CE de SEQ ID NO: 58, 60, 62, 64, 66 o 68.

5 Estos elementos CE alternativos se emplean normalmente con elementos CE de Gag de la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20150056237, cuyas secuencias se muestran en la figura 23.

10 En algunos aspectos, la divulgación proporciona polipéptidos con CE de Gag que incluyen los siguientes CE: P24CE8-1, p24CE9-1, p24CE3-1, p24CE10-1, p24CE5-1, p24CE11-1, p24CE6-1, p24CE12-1, p24CE13-1; o un polipéptido con CE de Gag que comprende P24CE8-2, p24CE9-2, p24CE3-2, p24CE10-2, p24CE5-2, p24CE11-2, p24CE6-2, p24CE12-2, p24CE13-2. Los dos polipéptidos normalmente se utilizan conjuntamente para cubrir casi toda la diversidad observada en aquellos elementos conservados en las secuencias Gag del VIH que se producen de forma natural. Cada uno de los dos polipéptidos con CE de Gag incluye elementos CE que se corresponden entre sí, pero
15 que difieren en un pequeño número de posiciones de aminoácidos (véase la figura 23). En algunas realizaciones, los CE de un polipéptido con CE de Gag se pueden presentar en un orden que difiere del orden mostrado para los polipéptidos con CE de Gag ilustrativos anteriores.

20 En algunas realizaciones, un polipéptido con CE de Gag del VIH puede comprender p24CE8 en lugar de p24CE1; p24CE9 en lugar de p24CE2; y/o p24CE13 en lugar de p24CE7 como se muestra en la figura 23. En algunas realizaciones, un polipéptido con CE de Gag del VIH puede comprender adicionalmente CE12 y CE6. En algunas realizaciones, un polipéptido con CE de Gag del VIH puede comprender adicionalmente CE11.

25 En la presente divulgación, se emplea una construcción de ácido nucleico con elementos conservados en una pauta de inmunización que también emplea un ácido nucleico que codifica una proteína de longitud completa, o una proteína sustancialmente de longitud completa, de donde se obtienen los elementos conservados. En el contexto de la presente divulgación, "sustancialmente de longitud completa" se refiere a la región de la proteína que incluye todos los elementos conservados, es decir, se proporciona una longitud suficiente de una proteína de origen natural que incluye todos los elementos conservados que se utilizan en la construcción con elementos conservados. En la presente
30 divulgación, la administración de una construcción de ácido nucleico que codifica una proteína de longitud completa excluye la administración de un genoma vírico, por ejemplo, un genoma del VIH, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína. En algunas realizaciones, una construcción de ácido nucleico utilizada de acuerdo con un protocolo de tratamiento de la presente divulgación que codifica una proteína Gag o Env de longitud completa también puede codificar proteínas víricas adicionales, pero no codifica un complemento completo de proteínas víricas. Por ejemplo, dicha construcción de ácido nucleico puede excluir secuencias que codifican uno o más
35 polipéptidos reguladores, tales como Tat.

40 Una construcción de ácido nucleico que codifica una proteína de longitud completa, o una proteína sustancialmente de longitud completa, se administra después de la administración de una o más construcciones que codifican el polipéptido(s) con CE, de tal manera que el polipéptido(s) con CE actúa como primovacunación y el polipéptido de longitud completa, o polipéptido sustancialmente de longitud completa, es un refuerzo. En la presente divulgación, el refuerzo comprende preferentemente administrar conjuntamente la una o más construcciones de ácido nucleico que codifican el polipéptido(s) con CE con la construcción de ácido nucleico que codifica el polipéptido de longitud completa, o polipéptidos sustancialmente de longitud completa. El refuerzo normalmente se administra en cualquier
45 momento de aproximadamente uno, aproximadamente dos, aproximadamente tres o aproximadamente cuatro meses; o incluso aproximadamente un año, o más, después de la administración de las primovacunaciones iniciales. Se pueden utilizar múltiples vacunas de refuerzo y se pueden utilizar diferentes proteínas de longitud completa en una secuencia de refuerzos. Una primera vacunación puede ser única o múltiple, por ejemplo, 2, 3, 4 o 5 administraciones del polipéptido(s) con CE. Los polipéptidos con CE y un polipéptido de longitud completa, o polipéptido sustancialmente de longitud completa, se administran preferentemente al hospedador mediante la administración de construcciones de expresión que codifican los polipéptidos, aunque en algunos aspectos de la divulgación, los polipéptidos se administran en forma de proteína. Se pueden emplear formas proteicas en las administraciones primaria o de refuerzo.

55 En la presente divulgación, primero se administran construcciones de ácido nucleico que codifican los polipéptidos con CE que se administran en la primovacunación de la pauta de vacunación, es decir, al sujeto no se le ha administrado un ácido nucleico que codifique el polipéptido de longitud completa, o sustancialmente de longitud completa, ya sea antes o de manera simultánea con la administración de las construcciones con CE. Por lo tanto, por ejemplo, un método para inducir una respuesta inmunitaria en el sujeto puede comprender la administración de una o más construcciones de ácido nucleico que codifican una construcción polipeptídica con CE de Gag como
60 primovacunación seguida de la administración de un polipéptido Gag de longitud completa, o sustancialmente de longitud completa, como etapa de refuerzo, donde la etapa de refuerzo también comprende la administración conjunta de las construcciones con CE nuevamente.

65 La primovacunación inicial de las construcciones con CE también puede comprender la administración de construcciones con CE para otro polipéptido para el cual se desea provocar una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, se pueden administrar una o más construcciones con CE de Gag de manera secuencial o simultánea con una o más

construcciones con CE de Env en la fase de primovacunación inicial de la pauta de vacunación. Como se ha indicado anteriormente, la primovacunación se produce antes de la administración de la forma completa o sustancialmente completa de cualquiera de los antígenos.

5 Los ácidos nucleicos que codifican múltiples polipéptidos con CE, normalmente dos polipéptidos con CE, es decir, un par de polipéptidos con elementos conservados, se administran en combinación. En el contexto de la actual invención, las construcciones de ácido nucleico que codifican polipéptidos con CE "administradas en combinación", también denominados en el presente documento como "administración conjunta", pueden administrarse juntas o por separado. Por ejemplo, una construcción de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido con CE puede administrarse
10 después (por ejemplo, desde 1 minuto a 60 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas o hasta 2 semanas) de la administración de una primera construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido con CE, pero normalmente se administra al mismo tiempo que la primera construcción de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con CE se administra dentro de las 24 horas siguientes a la administración de la construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con
15 CE.

De manera similar, para la administración conjunta de uno o más polipéptidos con CE con el polipéptido de longitud completa, o sustancialmente de longitud completa, administrado como refuerzo, la administración conjunta puede formarse mediante la administración de las construcciones juntas, o pueden administrarse por separado. Por ejemplo,
20 una o más construcciones de ácido nucleico que codifican uno o más polipéptidos con CE pueden administrarse poco antes (por ejemplo, desde 1 minuto a 60 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, generalmente dentro de las 24 horas) o después de una construcción de ácido nucleico que codifica el polipéptido de longitud completa, o el polipéptido sustancialmente de longitud completa.

25 En algunas realizaciones, en una administración de refuerzo, la una o más construcciones de ácido nucleico con CE se administran conjuntamente con una construcción de ácido nucleico que codifica una proteína de longitud completa, o sustancialmente de longitud completa. En el contexto de la presente divulgación, la "administración conjunta" se refiere a administrar las construcciones de ácido nucleico juntas en el mismo sitio, por ejemplo, administrándolos en la misma mezcla.
30

En algunas realizaciones, una pauta de inmunización con ácido nucleico de acuerdo con la divulgación comprende realizar al menos dos administraciones de primovacunación con una o más construcciones de ácidos nucleicos con CE, que codifican un par de elementos conservados, ya sea en vectores separados o en el mismo vector, seguido de realizar al menos dos administraciones de refuerzo de la construcción o construcciones de ácido nucleico con CE
35 administradas conjuntamente con la construcción que codifica el polipéptido de longitud completa o el polipéptido sustancialmente de longitud completa. En algunas realizaciones, las primovacunaciones se pueden realizar con al menos dos semanas de diferencia. En algunas realizaciones, las primovacunaciones se realizan con al menos un mes de diferencia o con varios meses de separación. Las vacunas de refuerzo generalmente se administran al menos aproximadamente un mes, a menudo al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 meses; o 1 o más años después de las primovacunaciones.
40

En los métodos de la divulgación, una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido con CE se introduce directamente en las células del individuo que recibe la composición inmunógena, es decir, el polipéptido con CE se administra al hospedador mediante la expresión en las células hospedadoras de la construcción de ácido nucleico que
45 codifica el polipéptido. Este enfoque se describe, por ejemplo, en Wolff *et al.*, Science 247:1465 (1990), así como en las patentes de Estados Unidos n.º 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; y en el documento WO 98/04720. Ejemplos de tecnologías de administración basadas en ADN incluyen, "ADN desnudo", administración facilitada (bupivacaína, polímeros, mediada por péptidos) y complejos lipídicos catiónicos o liposomas. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se administran mediante administración balística como se describe, por
50 ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.204.253 o a presión (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.922.687).

En algunas realizaciones, las composiciones inmunógenas de la divulgación se administran mediante inyección o electroporación, o una combinación de inyección y electroporación. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede administrar mediante inyección intramuscular o intradérmica y puede incluir electroporación *in vivo* para mejorar la absorción de ADN.
55

En algunas realizaciones, por ejemplo, cuando una construcción de ácido nucleico está codificada por un vector vírico, la construcción de ácido nucleico se puede administrar mediante la infección de las células con el virus que contiene el vector. Esto se puede realizar utilizando una administración conocida.
60

Para aspectos de la divulgación que emplean la administración de un polipéptido en forma de proteína, en lugar de expresar la proteína en la célula hospedadora con una construcción de ácido nucleico, las proteínas normalmente se producen en un sistema de expresión celular *in vitro* y se aíslan para la administración al sujeto. Dichos sistemas de expresión celular son bien conocidos en la materia.
65

Se pueden emplear construcciones de ácido nucleico como vectores de expresión de plásmidos o se pueden administrar como un virus. En algunas realizaciones, las construcciones de ácido nucleico que codifican los elementos conservados y/o polipéptidos del VIH de longitud completa son una o más moléculas de ácido nucleico purificadas, por ejemplo, uno o más vectores basados en plásmidos de ADN (ADN "desnudo").

5 En algunas realizaciones, una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido inmunógeno con CE está contenida dentro de un vector vírico y se administra como un virus. Los sistemas de administración de virus incluyen vectores de adenovirus, vectores víricos adenoasociados, vectores víricos del herpes simple, vectores retrovíricos, vectores víricos de la viruela, vectores lentivíricos, vectores de alfavirus, vectores de poliovirus y otros virus de ARN
10 de cadena positiva y negativa, viroides y virusoides, o partes de los mismos. Los métodos para construir y utilizar dichos vectores son bien conocidos en la materia.

Por ejemplo, se pueden utilizar virus recombinantes de la familia de virus pox para administrar las moléculas de ácido nucleico. Entre ellos se incluyen los virus de la vaccinia y los poxvirus aviares, tales como los virus de la viruela aviar y de la viruela del canario. Los métodos para producir poxvirus recombinantes se conocen en la materia y emplean recombinación genética. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 91/12882, WO 89/03429 y WO 92/03545. Una
15 revisión detallada de esta tecnología se encuentra en la patente de Estados Unidos n.º 5.863.542. Ejemplos representativos de poxvirus recombinantes incluyen ALVAC, TROVAC y NYVAC.

Varios vectores de adenovirus, incluidos Ad2, Ad5 y Ad7, también se han descrito que se pueden utilizar para administrar una o más de las construcciones de ácido nucleico como se describen en el presente documento (Haj-Ahmad y Graham, J. Virol. (1986) 57:267-274; Bett *et al.*, J. Virol. (1993) 67:5911-5921; Mittereder *et al.*, Human Gene Therapy (1994) 5:717-729; Seth *et al.*, J. Virol. (1994) 68:933-940; Barr *et al.*, Gene Therapy (1994) 1:51-58; Berkner, K. L. BioTechniques (1988) 6:616-629; y Rich *et al.*, Human Gene Therapy (1993) 4:461-476). Además, se han
20 desarrollado varios sistemas de vectores de virus adenoasociados (AAV) para la administración de genes. Los vectores AAV se pueden construir fácilmente mediante técnicas bien conocidas en la materia. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.173.414 y 5.139.941; las publicaciones internacionales n.º WO 92/01070 (publicada el 23 de enero de 1992) y WO 93/03769 (publicada el 4 de marzo de 1993); Lebkowski *et al.*, Molec. Cell. Biol. (1988) 8:3988-3996; Vincent *et al.*, Vaccines 90 (1990) (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. Current Opinion in Biotechnology (1992) 3:533-539; Muzyczka, N. Current Topics in Microbiol and Immunol. (1992) 158:97-129; Kotin, R. M. Human Gene Therapy (1994) 5:793-801; Shelling y Smith, Gene Therapy (1994) 1:165-169; y Zhou *et al.*, J. Exp. Med. (1994) 179:1867-1875.

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

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

Construcciones de expresión que codifican polipéptidos de fusión que comprenden una señal de degradación o una secuencia de péptido señal

En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido con elementos conservados codifica una forma en la que el elemento conservado está fusionado a una secuencia para potenciar la respuesta inmunitaria, tal como una secuencia de péptido señal o una secuencia que se dirige a la proteína para su degradación lisosómica. Dichas realizaciones normalmente dan como resultado respuestas inmunitarias mejoradas en comparación con realizaciones en las que la vacuna con elementos conservados no está fusionada a un péptido señal o señal de degradación.

Secuencia de direccionamiento lisosómico

En algunas realizaciones, se pueden emplear señales que dirigen proteínas al lisosoma. Por ejemplo, las proteínas 1 y 2 de membrana asociadas a lisosomas (LAMP-1 y LAMP-2) incluyen una región que dirige proteínas al lisosoma. Se proporcionan ejemplos de secuencias dirigidas a lisosomas, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 5.633.234; 6.248.565; y 6.294.378.

Las secuencias desestabilizadoras presentes en proteínas particulares son bien conocidas en la materia. Las secuencias de desestabilización ilustrativas incluyen los aa 2 a 120 de c-myc; los aa 13 a 91 de ciclina A; los aa 13 a

91 de ciclina B; los aa 20 a 45 de Ikb α ; los aa 19 a 44 de β -catenina; los aa 18 a 47 de β -catenina, los aa 1 a 67 de c-Jun; y los aa 1 a 35 de c-Mos; y fragmentos y variantes de aquellos segmentos que median en la desestabilización. Dichos fragmentos se pueden identificar mediante cualquier método. Por ejemplo, la semivida del polipéptido se puede determinar mediante un ensayo de seguimiento de pulsos que detecta la cantidad de polipéptido que está presente a lo largo del tiempo utilizando un anticuerpo contra el polipéptido o contra un marcador unido al polipéptido. Se describen ensayos ilustrativos, por ejemplo, en el documento WO02/36806.

Las variantes de dichas secuencias, por ejemplo, que tengan al menos un 90 % de identidad, normalmente al menos un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, 99 % o más de identidad con las secuencias mencionadas anteriormente, por ejemplo, una secuencia de degradación de LAMP, se pueden emplear en esta invención.

Las señales de degradación adicionales que se pueden utilizar para modificar antígenos retrovéricos, por ejemplo, antígenos del VIH, de acuerdo con la invención incluyen la señal de degradación F-box, tal como la señal F-BOX de 47 aa (del 182 al 228) de la proteína beta-TrCP (Liu, *et al.*, Biochem Biophys Res Comm. 313:1023-1029, 2004). Por consiguiente, en algunas realizaciones, un vector de expresión para su uso en la invención puede codificar una proteína de fusión en la que una señal de degradación F-box está unida a un polipéptido del VIH, por ejemplo, un polipéptido con EC de Env del VIH como se describe en el presente documento.

Direccionamiento al proteosoma y otras señales de degradación

En la materia se conocen muchas secuencias polipeptídicas que se dirigen a una proteína para su degradación. Un ejemplo de secuencias desestabilizadoras son las llamadas secuencias PEST, que son abundantes en los aminoácidos Pro, Asp, Glu, Ser, Thr (no es necesario que estén en un orden particular) y pueden aparecer en posiciones internas en una secuencia de proteínas. Varias proteínas que, según se informa, tienen elementos de secuencia PEST se dirigen rápidamente al proteosoma 26S. Una secuencia PEST normalmente se correlaciona con a) bucles o giros expuestos en la superficie previstos y b) sitios de fosforilación de serina, por ejemplo, el motivo S/TP es el sitio diana de las cinasas dependientes de ciclina.

Secuencias de desestabilización adicionales está relacionadas con secuencias presentes en la región aminoterminal. En particular, la tasa de ubiquitinación, que se dirige a las proteínas para su degradación mediante el proteosoma 26S puede estar influenciado por la identidad del resto aminoterminal de la proteína. Por lo tanto, las secuencias de desestabilización también pueden comprender dichos restos aminoterminales, dirigidos por la "regla del extremo N" (véase, por ejemplo, Tobery *et al.*, J. Exp. Med. 185:909-920.).

Otras señales de direccionamiento incluyen la secuencia de caja de destrucción que está presente, por ejemplo, en ciclinas. Dicha caja de destrucción tiene un motivo de 9 aminoácidos, R1(A/T)2(A)3L4(G)SX6(I/V)7(G/T)8(N)9, en la que los únicos restos invariables son R y L en las posiciones 1 y 4, respectivamente. Los restos que se muestran entre paréntesis aparecen en la mayoría de las secuencias de destrucción (véase, por ejemplo, Hershko y Ciechanover, Annu. Rev. Biochem. 67:425-79, 1998). En otros casos, las secuencias de desestabilización conducen a la fosforilación de una proteína en un resto de serina (por ejemplo, Ikb α).

En algunas realizaciones, un polipéptido con elementos conservados de la invención se fusiona a una secuencia de degradación de LAMP. Por ejemplo, los métodos de la invención pueden emplear un polipéptido en el que la SEQ ID NO: 24, o la SEQ ID NO: 25, o la SEQ ID NO: 40 o 41, está fusionada a una secuencia de degradación de LAMP.

Construcciones de expresión que codifican proteínas de fusión secretadas

Un polipéptido secretor en el contexto de esta invención es una secuencia señal polipeptídica que da como resultado la secreción de la proteína a la que está unida. En algunas realizaciones, el polipéptido secretor es una quimiocina, citocina, linfocina, o un fragmento de la quimiocina, citocina o linfocina que conserva la actividad inmunoestimuladora. Ejemplos de polipéptidos secretores de quimiocinas incluyen MCP-3 e IP-10. En otras realizaciones, el polipéptido secretor es una secuencia señal polipeptídica de una proteína secretada tal como la proteína activadora del plasminógeno tisular (tPA), hormona del crecimiento, GM-CSF, una citocina o una proteína inmunoglobulina. Se divulgan construcciones que codifican proteínas de fusión secretoras, por ejemplo, en el documento WO02/36806.

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

En algunas realizaciones, una señal secretora para su uso en la invención son los aminoácidos 33 a 109 de MCP-3, por ejemplo, unidos a un péptido secretor IP-10.

En algunas realizaciones, un polipéptido con elementos conservados puede ser la SEQ ID NO: 24 fusionada a un péptido señal; o puede comprender la SEQ ID NO: 25 fusionada a un péptido señal. El péptido señal puede ser un péptido señal de Env del VIH nativo o un péptido señal heterólogo. En algunas realizaciones, un polipéptido con elementos conservados puede ser la SEQ ID NO: 40 fusionada a un péptido señal; o puede comprender la SEQ ID

NO: 41 fusionada a un péptido señal. El péptido señal puede ser un péptido señal del VIH nativo o un péptido señal heterólogo.

De manera similar, una construcción de expresión que codifica un polipéptido de longitud completa, o un polipéptido sustancialmente de longitud completa, también puede modificarse con una secuencia secretora, por ejemplo, un péptido señal heterólogo o una secuencia de péptido de degradación. Por otra parte, se puede administrar más de una construcción que codifica el polipéptido de longitud completa, o polipéptidos sustancialmente de longitud completa. Por ejemplo, se puede utilizar una construcción en la que Gag (o Env) está fusionada a un polipéptido señal junto con una construcción en la que Gag (o Env) está fusionada a una secuencia de degradación.

Propiedades adicionales de las construcciones de expresión

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

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

Otros componentes del vector de expresión son bien conocidos en la materia, e incluyen, pero sin limitación, los siguientes: elementos potenciadores de la transcripción, señales de terminación de la transcripción, secuencias de poliadenilación, sitios de corte y empalme, secuencias para la optimización del inicio de la traducción y secuencias de terminación de la traducción.

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

En realizaciones típicas, las construcciones de ácido nucleico tienen codones optimizados para su expresión en un ser humano.

Como se señala aquí, en la presente divulgación, una molécula de "ácido nucleico" puede incluir secuencias de ADNc y de ADN genómico, secuencias de ARN y de ácidos nucleicos sintéticos. Por lo tanto, "ácido nucleico" también abarca realizaciones en las que se emplean análogos de ADN y ARN.

Una composición inmunógena se puede administrar como una o más construcciones. Por ejemplo, cuando se emplean dos conjuntos de elementos conservados, por ejemplo, los polipéptidos con elementos conservados de Env del VIH de SEQ ID NO: 24 y 25, o los polipéptidos con elementos conservados de Gag del VIH de SEQ ID NO: 40 y 41, la construcción de ácido nucleico puede codificar ambos conjuntos, o cada conjunto puede estar codificado por un vector de expresión separado. Por lo tanto, las construcciones de expresión administradas de acuerdo con la invención pueden administrarse como múltiples vectores de expresión, o como uno o más vectores de expresión que codifican múltiples unidades de expresión, por ejemplo, vectores de expresión disistrónicos o de otro modo multicistrónicos. Por ejemplo, se puede emplear un vector de expresión que codifica tanto la SEQ ID NO: 24 como la SEQ ID NO: 25 o se pueden emplear múltiples vectores de expresión donde la SEQ ID NO: 24 está codificada por un vector y la SEQ ID NO: 25 está codificada por otro vector. De manera similar, se puede emplear un vector de expresión que codifica tanto la SEQ ID NO: 40 como la SEQ ID NO: 41 o se pueden emplear múltiples vectores de expresión donde la SEQ ID NO: 40 está codificada por un vector y la SEQ ID NO: 41 está codificada por otro vector.

En algunas realizaciones, se pueden emplear múltiples construcciones de ácido nucleico que codifican un polipéptido con CE de Gag o de Env del VIH. Por ejemplo, se puede utilizar una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido con CE de Env del VIH fusionado a un péptido señal en combinación con una construcción de ácido nucleico que codifica el polipéptido con CE de Env del VIH fusionado a una señal de degradación; y/o se puede utilizar una construcción de ácido nucleico que codifica un polipéptido con CE de Gag del VIH fusionado a un péptido señal en combinación con una construcción de ácido nucleico que codifica el polipéptido con CE de Gag del VIH fusionado a una señal de degradación. Por lo tanto, en una vacuna se pueden utilizar múltiples construcciones que codifican un

polipéptido con CE del VIH deseado.

Administración de composiciones inmunógenas como péptidos

- 5 En algunos aspectos, los polipéptidos con CE, por ejemplo, los polipéptidos con CE de Gag o Env del VIH como los de la presente divulgación, se administran a un sujeto en forma de proteína. Por lo tanto, en algunos aspectos, a un sujeto se le administran múltiples, normalmente dos, polipéptidos con CE del VIH. Como se explica en el contexto de la administración de una construcción de ácido nucleico, los polipéptidos con CE "administrados en combinación" pueden administrarse juntos o por separado. Por ejemplo, se puede administrar un primer polipéptido con CE antes de (por ejemplo, desde 1 minuto a 60 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, o 1 semana o más) la administración de un segundo polipéptido con CE.

También se puede administrar una proteína de longitud completa o una proteína de longitud sustancialmente completa en forma de proteína. En un aspecto, se administra un polipéptido de longitud completa o un polipéptido sustancialmente de longitud completa después de la administración de un polipéptido con CE, de modo que el polipéptido con CE actúa como primovacunación y el polipéptido de longitud completa, o el polipéptido sustancialmente de longitud completa, es un refuerzo. En aspectos preferidos, el polipéptido de longitud completa o sustancialmente de longitud completa se administra en una etapa de refuerzo que también comprende la administración del polipéptido o polipéptidos con CE. El refuerzo normalmente se administra entre dos semanas y una, dos, tres o cuatro meses o más tiempo, después de la administración de las primovacunaciones iniciales. Una primovacunación puede ser en sí misma una o múltiples administraciones del polipéptido con CE. En algunos aspectos, se administra un refuerzo de un polipéptido de longitud completa, o sustancialmente de longitud completa, en combinación con una administración adicional del polipéptido(s) con CE, de modo que el polipéptido con CE no sólo se administra como una etapa de primovacunación, sino como parte de la etapa de refuerzo que comprende administrar un polipéptido de longitud completa o sustancialmente de longitud completa.

En algunos aspectos, tanto los ácidos nucleicos de polipéptidos con CE de acuerdo con la divulgación como las formas proteicas de los polipéptidos con CE pueden administrarse a un sujeto en diversos momentos en una pauta de vacunación. De manera similar, las construcciones de ácido nucleico que codifican una proteína de longitud completa, o una proteína sustancialmente de longitud completa, se pueden utilizar en pautas de vacunas que también emplean formas proteicas de la proteína de longitud completa, o de la proteína sustancialmente de longitud completa. En algunos aspectos, se puede administrar una proteína de longitud completa en forma de partícula vírica.

Evaluación de la respuesta inmunitaria

Para evaluar el sistema inmunitario de un paciente durante y después del tratamiento y para evaluar adicionalmente la pauta de tratamiento, se pueden medir varios parámetros. Las medidas para evaluar las respuestas inmunitarias incluyen: mediciones de anticuerpos en el plasma, suero u otros líquidos corporales; análisis de la proliferación celular *in vitro* en respuesta a un antígeno específico, que indican la función de las células CD4+, y análisis de las respuestas de CD8+. Dichos ensayos son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, para medir los linfocitos T CD4+, muchos laboratorios miden los niveles absolutos de linfocitos T CD4+ en sangre completa mediante un proceso multiplataforma de tres etapas. Hay sistemas disponibles comercialmente para medir las células CD4+. Por ejemplo, hay sistemas FAC disponibles comercialmente que miden automáticamente los linfocitos T CD4+, CD8+ y CD3+ absolutos.

Otras mediciones de la respuesta inmunitaria incluyen la evaluación de las respuestas de CD8+. Estas técnicas son bien conocidas. Se pueden medir las respuestas de los linfocitos T CD8+, por ejemplo, mediante el uso de tinción con tetrámeros de PBMC frescas o cultivadas (véase, por ejemplo, Altman, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10330, 1993; Altman, *et al.*, Science 274:94, 1996), o mediante ensayos de liberación de interferón γ , tales como ensayos ELISPOT (véase, por ejemplo, Lalvani, *et al.*, J. Exp. Med. 186:859, 1997; Dunbar, *et al.*, Curr. Biol. 8:413, 1998; Murali-Krishna, *et al.*, Immunity 8:177, 1998), o mediante el uso de ensayos de citotoxicidad funcional.

Cantidad de virus

La viremia se mide mediante la evaluación de la cantidad de virus en un paciente. Hay una variedad de métodos para realizar esto. Por ejemplo, las concentraciones en plasma de ARN del VIH se pueden cuantificar mediante cualquiera de los métodos de amplificación diana (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa RT cuantitativa [RT-PCR], ensayo Amplicor HIV Monitor, sistemas moleculares Roche; o amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos, [NASBA[®]], NucliSens[™] HIV-1 QT assay, Organon Teknika) o métodos de amplificación de señales (por ejemplo, ADN ramificado [ADNr], ensayo de ADNr de ARN del VIH Quantiplex[™], Chiron Diagnostics). El método de amplificación de la señal de ADNr amplifica la señal obtenida de una diana de ARN del VIH capturada mediante el uso de etapas secuenciales de hibridación de oligonucleótidos, mientras que los ensayos de RT-PCR y NASBA[®] utilizan métodos enzimáticos para amplificar el ARN del VIH diana en cantidades mensurables de producto de ácido nucleico. Las secuencias de ARN del VIH diana se cuantifican mediante la comparación con patrones de referencia internos o externos, dependiendo del ensayo utilizado.

Administración de construcciones de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos para administración a un sujeto se formulan para administración farmacéutica. Aunque en las composiciones farmacéuticas de esta invención se puede emplear cualquier vehículo adecuado conocido por los expertos en la materia, el tipo de vehículo variará de acuerdo con el modo de administración. Para administración parenteral, incluida la inyección intranasal, intradérmica, subcutánea o intramuscular o la electroporación, el vehículo comprende preferentemente agua, solución salina y opcionalmente un alcohol, una grasa, un polímero, una cera, uno o más aminoácidos estabilizantes o un tampón. Las tecnologías de formulación generales son conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (22.^a edición), Allan, ed; 2012, Lippincott Williams & Wilkins; Injectable Dispersed Systems: Formulation, Processing And Performance, Burgess, ed., 2005, CRC Press; y Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, 2000, Taylor & Francis).

Las composiciones inmunógenas de ADN se pueden administrar una o varias veces. La vacunación con ADN se realiza más de una vez, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20 o más veces según sea necesario para inducir la respuesta deseada (por ejemplo, una respuesta antigénica específica o proliferación de células inmunitarias). Se pueden realizar múltiples administraciones, por ejemplo, quincenalmente, semanalmente, bimensualmente, mensualmente, o con mayor o menor frecuencia, según sea necesario, durante un período de tiempo suficiente para lograr la respuesta deseada.

Las construcciones de ácido nucleico de acuerdo con la invención se administran a un hospedador mamífero. El hospedador mamífero suele ser un ser humano o un primate. En algunas realizaciones, el hospedador mamífero puede ser un animal doméstico, por ejemplo, canino, felino, lagomorfo, rodentia, rattus, hámster, murino. En otra realización, el hospedador mamífero es un animal agrícola, por ejemplo, bovino, ovino, porcino, equino, etc.

Las composiciones inmunógenas que contienen las construcciones de expresión de ADN se pueden formular de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia farmacéutica. Dichas composiciones se pueden administrar en dosis y mediante técnicas bien conocidas por los expertos en la materia médica teniendo en cuenta factores tales como la edad, sexo, peso y condición del paciente particular y la vía de administración.

En aplicaciones terapéuticas, las vacunas se administran a un paciente en una cantidad suficiente para provocar un efecto terapéutico, por ejemplo, una respuesta de CD8⁺, CD4⁺ y/o anticuerpos a los antígenos del VIH-1 codificados por las vacunas que detiene o retarda al menos parcialmente los síntomas, o y/o las complicaciones de la infección por VIH. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de, por ejemplo, la composición particular de la pauta de vacunación administrada, la forma de administración, el estadio y la intensidad de la enfermedad, el estado general de salud del paciente y el criterio del médico prescriptor.

Las vacunas de ácido nucleico se administran mediante métodos bien conocidos en la materia como se describe en Donnelly *et al.* (Ann. Rev. Immunol. 15:617-648 (1997)); Felgner *et al.* (Patente de Estados Unidos n.º 5.580.859, publicada el 3 de diciembre de 1996); Felgner (Patente de Estados Unidos n.º 5.703.055, publicada el 30 de diciembre de 1997); y Carson *et al.* (Patente de Estados Unidos n.º 5.679.647, publicada el 21 de octubre de 1997). Un experto en la materia sabría que la elección de un vehículo farmacéuticamente aceptable, incluyendo un compuesto fisiológicamente aceptable, depende, por ejemplo, de la vía de administración del vector de expresión.

Como se ha indicado anteriormente, las composiciones de ADN inmunógenas se pueden administrar a través de una variedad de vías. Las vías de administración típicas incluyen la administración parenteral, por ejemplo, vía intradérmica, intramuscular o subcutánea. La administración de vectores de expresión de la invención al músculo y mediante electroporación puede ser un método de administración particularmente eficaz, que incluye inyecciones intradérmicas y subcutáneas y la administración transdérmica. La administración transdérmica, tal como por iontoforesis, también es un método eficaz para administrar vectores de expresión de la invención al músculo. También se puede emplear la administración epidérmica de vectores de expresión de la invención. La administración epidérmica implica irritar mecánicamente o químicamente la capa más externa de la epidermis para estimular una respuesta inmunitaria al irritante (Carson *et al.*, patente de Estados Unidos n.º 5.679.647).

Los ácidos nucleicos se pueden administrar en solución (por ejemplo, una solución salina tamponada con fosfato) mediante inyección, en general por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular. En realizaciones que emplean una composición de ácido nucleico desnudo, la dosis de una composición de ácido nucleico desnudo es de aproximadamente 1,0 ng a aproximadamente 10 mg para un paciente normal de 70 kilogramos. Las dosis subcutáneas o intramusculares de ácido nucleico desnudo (normalmente ADN) pueden variar de 0,1 µg a 100 µg para un paciente de 70 kg que goza de buena salud en general. Por ejemplo, una vacuna de ADN contra el VIH, por ejemplo, de ADN desnudo o polinucleótido en un portador acuoso, se puede inyectar en el tejido, por ejemplo, por vía intramuscular o intradérmica, en cantidades de 10 µl por sitio a aproximadamente 1 ml por sitio. La concentración de polinucleótido en la formulación suele ser de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 4 mg/ml. En algunas realizaciones, el ADN puede administrarse en cantidades de ng, por ejemplo a un nivel de 1 a 100 ng.

En aspectos en los que uno o más de los componentes de una pauta de vacunación se administran en forma de proteína, la proteína normalmente se administra a una concentración que se determina mediante técnicas conocidas teniendo en cuenta consideraciones médicas con respecto al sujeto. Las dosis para la administración de una composición polipeptídica incluyen cantidades de miligramos o microgramos por kilogramo. Las dosis ilustrativas son de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 500 mg/kg. Por ejemplo, las dosis pueden variar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 µg/kg o de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 50 µg/kg. En algunas realizaciones, la dosis es de aproximadamente 0,5 µg/kg o más, 1 µg/kg o más, 2 µg/kg o más, 5 µg/kg o más, 10 µg/kg o más, 25 µg/kg o más, o 50 µg/kg o más.

10 Ta y como lo entiende un experto en la materia, las dosis pueden variar dependiendo de la vía de administración.

La proteína se formula mediante técnicas bien conocidas para la administración que emplean diversas vías, por ejemplo, administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intranasal, transdérmica o intraperitoneal.

15 La vacuna puede administrarse en una solución fisiológicamente compatible, tal como PBS estéril. Las vacunas también podrán liofilizarse antes de su administración. Como bien saben los expertos en la materia, la dosis puede ser proporcional al peso.

20 Las composiciones incluidas en la pauta descrita en el presente documento para inducir una respuesta inmunitaria se pueden administrar solas, o se pueden administrar de manera conjunta o secuencial con otras composiciones inmunógenas, antigénicas, de vacuna o terapéuticas.

25 Las composiciones que también pueden administrarse con las vacunas incluyen otros agentes para potenciar o ampliar la respuesta inmunitaria, por ejemplo, ligando IL-15, IL-12, IL-2 o CD40, que se pueden administrar en intervalos de tiempo específicos o administrarse de manera continua.

30 Además, las vacunas pueden formar complejos con otros componentes tales como péptidos, polipéptidos e hidratos de carbono para la administración. Por ejemplo, los vectores de expresión, es decir, los vectores de ácido nucleico que no están contenidos dentro de una partícula vírica, puede formar complejos con partículas o perlas que se pueden administrar a un individuo, por ejemplo, mediante una pistola de vacunas.

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

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

50 EJEMPLOS QUE ILUSTRAN LA INVENCION

Ejemplo 1. Ilustración de respuestas inmunitarias mejoradas obtenidas con la primovacunación con la construcción con CE seguida de polipéptidos con CE de longitud completa como refuerzo

55 Este ejemplo evaluó vacunas combinadas primarias y de refuerzo para aumentar la amplitud de la inmunidad. Además de la primovacunación con CE y el refuerzo con moléculas de longitud completa, se descubrió que el uso de un refuerzo que implicaba la administración conjunta de CE y una molécula de longitud completa daba como resultado una amplitud de las respuestas significativamente mejorada. Este refuerzo provocó además niveles más elevados de linfocitos T citotóxicos que centran las respuestas inmunitarias en los epítomos altamente conservados.

60 Método: este estudio se realizó utilizando una vacuna de ADNp con elementos conservados procedentes del virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS) que se diseñó a partir de la proteína de la cápside p27^{gag} del VIS por analogía con una vacuna con CE contra el VIH. La p27^{gag} del VIS es el producto del procesamiento proteolítico procedente de la proteína p57^{gag} del VIS de longitud completa. Se identificaron siete elementos altamente conservados dentro de la proteína de la cápside p27^{gag} por (i) analogía con las secuencias de CE del VIH y (ii) conservación de secuencias entre las secuencias del VIS disponibles (Figura 1). Se generaron dos conjuntos de secuencias, p27CE1 y p27CE2, que se diferencian en seis aa 'de alternancia'. Se probaron vectores de ADN que expresan las proteínas p27CE1 y p27CE2

del VIS en macacos.

Los macacos (N = 14) recibieron vacunas con una mezcla de ADNp de p27CE1 y ADNp de p27CE2 del de VIS, denominada como ADNp de p27 del VIS (Figura 2). Las respuestas inmunitarias celulares específicas de CE se compararon en sangre. Se estimularon PBMC con un conjunto de péptidos específicos de CE del VIS y se mostró la inducción de respuestas específicas de CE sólidas que variaban del 0,03 al 0,8 % del total de linfocitos T. Los linfocitos T específicos de CE mostraron un fenotipo tanto de memoria central (CD28⁺, CD95⁺) como de memoria efectora (EM, CD28⁻, CD95⁺) con una fracción significativa de linfocitos T citotóxicos (IFN- γ ⁺, granzima B⁺, CD107a⁺). En cambio, solo ~60 % de los macacos vacunados (18 de 31 animales vacunados) con un plásmido que expresa Gag de longitud completa del VIS desarrollaron respuestas que reconocían cualquier CE, aunque desarrollaron sólidas respuestas inmunitarias celulares a regiones variables de gag. Estos datos son similares a los resultados encontrados en animales vacunados con ADN de *gag* del VIH (Kulkarni *et al.*, PLoS One;9:e86254. 2014).

Para ampliar aún más la potencia de la vacunación de refuerzo, se compararon dos pautas diferentes utilizando macacos primovacunados con ADNp con CE del VIS (Figura 3): (i) Como primovacunación, los animales (N = 6) recibieron vacunas de ADNp de p27CE y como refuerzo (1 \times) ADN de *gag* como se describió anteriormente (por analogía con la pauta de refuerzo del VIH). (ii) Otro grupo de animales (N = 6) recibió una única vacuna de ADNp de p27CE como vacuna primaria y como refuerzo la administración conjunta (2 \times) de ADN con CE y de *gag*. Las respuestas inmunitarias específicas de CE se midieron en sangre y las respuestas se mapearon utilizando grupos de péptidos específicos para cada uno de los CE del VIS individuales.

Los animales primovacunados con ADNp de p27CE del VIS (N = 6) recibieron una vacunación de refuerzo con un plásmido que expresaba el ADNp de p57^{99g} del VIS de longitud completa (Figura 4). Esto dio como resultado un aumento significativo en las respuestas específicas de CE, lo que corrobora la observación de los estudios de primovacunación con p24CE del VIH y de refuerzo con ADN de *gag*. Por lo tanto, tanto la vacuna de ADN de p27CE del VIS como la vacuna de ADNp de p24CE del VIH comparten la característica única de inducir de manera eficaz respuestas inmunitarias a epítomos subdominantes de Gag, lo cual sólo se logra de manera ineficaz mediante la vacunación con ADN que expresa Gag de longitud completa. También se demostró que para ambas vacunas con CE, un refuerzo con ADNp de *gag* aumentó significativamente la magnitud de estas respuestas.

El otro grupo de macacos primovacunados con CE (N = 6) recibió una vacuna de refuerzo mediante la administración conjunta del ADN con CE y un plásmido que expresa el ADNp de p57^{99g} del VIS de longitud completa (Figura 5). La comparación de la magnitud de las respuestas inmunitarias obtenidas tras la 1.^a y 2.^a vacunación de refuerzo mostró un aumento significativo ($p = 0,0022$) de la magnitud de las respuestas de linfocitos T específicos de CE tras el 2.^o refuerzo (Figura 5) alcanzando respuestas de hasta ~2 % del total de linfocitos T circulantes. Estos datos muestran que la inclusión de dos vacunas de refuerzo es ventajosa para aumentar la magnitud de las respuestas específicas de CE.

Si bien ambas pautas de refuerzo condujeron a un marcado aumento en la magnitud de las respuestas de CE, alcanzando niveles similares, se encontró una diferencia fundamental en la amplitud de las respuestas (Figura 6). El mapeo de las respuestas a CE individuales en los macacos primovacunados con CE (N=14) mostró una tasa de respuesta de 1 a 4 CE por animal (Figura 6). El mapeo de las respuestas suscitadas por el refuerzo solo con ADN de *gag* reveló el reconocimiento de 1 a 3 CE por animal (Figura 6). Por lo tanto, no se encontró ningún cambio en la amplitud al incluir la vacunación de refuerzo adicional con ADN de *gag* (sistemas modelo del VIS y VIH). En cambio, el refuerzo en animales primovacunados con CE mediante la administración conjunta de ADN con CE y de *gag* dio como resultado una mayor amplitud de las respuestas que reconocían de 2 a 6 CE por animal, siendo los 7 CE inmunógenos (Figura 6). La comparación de la tasa de respuesta (número de CE positivos por animal) mostró un aumento significativo ($p = 0,0195$, Prueba de Mann Whitney) en la amplitud mediante la administración conjunta de ADNp con CE y de *gag* como refuerzo.

Las respuestas inmunitarias específicas de CE inducidas se examinaron más a fondo en busca de marcadores de citotoxicidad (Figura 7). El análisis de los subconjuntos de linfocitos T CD4 y CD8 mostró un aumento significativo de células específicas de CE que albergan granzima B y son capaces de desgranularse (CD107a⁺) en los animales que recibieron el refuerzo de administración conjunta de ADN con CE y de *gag*. Se representan gráficamente las respuestas citotóxicas específicas de CE dentro de la población total de linfocitos T. Por lo tanto, la administración conjunta de ADN *gag* y con CE del de VIS como refuerzo no solo amplió las respuestas de los linfocitos T Gag, también indujo respuestas de linfocitos T citotóxicos específicas de CE más sólidas.

Por lo tanto, los datos obtenidos con la vacuna de ADN de p27CE del VIS demuestran que una vacunación de refuerzo que incluya la administración conjunta de ADNp con CE y de *gag* proporciona un aumento significativo en la amplitud de las respuestas específicas de CE en comparación con una pauta que utilizaba solo el refuerzo de ADNp de *gag*. Se propone la administración conjunta de ADNp con CE y ADNp que expresa la proteína de longitud completa como refuerzo para maximizar la inducción de respuestas de linfocitos T a epítomos subdominantes de Gag del VIH y esta estrategia se está probando actualmente.

En conjunto, estos datos corroboran la observación original que demuestra que la primovacunación con CE como

vacuna (ADN, vector vírico, proteína) es importante para permitir el desarrollo de respuestas inmunitarias a epítomos subdominantes. El ajuste de la vacunación de refuerzo mediante la inclusión de la administración conjunta con CE y la molécula inalterada de longitud completa ofrece una ventaja adicional para optimizar la amplitud y la calidad de las respuestas inmunitarias. Esta pauta es más eficaz que la primovacunación con ADN con CE y el refuerzo con ADN de gag incluso cuando se administraron refuerzos adicionales de ADN de gag.

En los seres humanos, las respuestas inmunogénicas se evaluarán en un ensayo que incluye la primovacunación con el ADN de p24CE del VIH (0, mes 2) seguida de 2 vacunas de refuerzo utilizando la administración conjunta de ADN de p24CE y ADN de p55gag (meses 4 y 6). En macacos, no se identificaron diferencias significativas entre 2 y 3 vacunaciones de ADN con CE, por lo tanto, se prevén dos primovacunaciones para fortalecer la etapa de primovacunación. Se aplicarán dos vacunas de refuerzo porque en el modelo de macaco, 2 refuerzos de administración conjunta proporcionaron mejores resultados. Este ensayo emplea un ADNp de p24CE1/2 de doble promotor (código de plásmido 306H, figura 8A) que abarca 5577 pares de bases (pb) y codifica los dos genes *p24CE* de expresión optimizada a partir de un único vector de expresión eucariota pDP.CMVkan, un derivado de pVR1012 (Hartikka *et al.*, 1996). El gen *p24CE1* se expresa a partir del promotor del citomegalovirus humano (hCMV) y finaliza mediante la señal de poliadenilación (poliA) de la hormona del crecimiento bovino (BGH, del inglés *bovine growth hormone*). El gen *p24CE2* se expresa a partir del promotor CMV de simio (sCMV) y finaliza mediante la señal de poliA del virus vacuolante de simio 40 (SV40). Las proteínas P24CE1 y p24CE2 contienen el péptido señal de GM-CSF de 17 aminoácidos (GenBank: AAA98768.1), que afecta favorablemente a la localización y estabilidad de las proteínas p24CE1 y p24CE2, así como a la naturaleza de las respuestas inmunitarias provocadas (Kulkarni *et al.*, 2013, citado anteriormente). Las secuencias de ambos genes están optimizadas para mejorar la expresión en células humanas.

En el refuerzo se utiliza un plásmido que codifica p55gag junto con el plásmido p24CE. El ADNp de p55gag (código de plásmido 114H, figura 8B) abarca 5518 pb y codifica la proteína p55gag de longitud completa del VIH-1 (clado B; GenBank NP_057850.1). La proteína p55gag tiene una longitud de 500 aminoácidos y contiene el producto de procesamiento proteolítico, p24gag, ubicado entre los aa 133 y 363. El gen *p55gag* de expresión optimizada se sintetizó químicamente y se insertó en el plásmido de expresión eucariota pCMVkan bajo el control del potenciador/promotor temprano inmediato de hCMV y se terminó mediante la señal de poliA de BGH. La estructura principal del plásmido pCMVkan procede de pVR1012 (Hartikka *et al.*, 1996). pCMVkan comparte la estructura principal con pDP.CMVkan, pero carece del promotor de CMV de simio y de la señal de poliadenilación de SV40.

La aplicación de este método no se limita al VIH, sino que puede modularse para abordar la inducción de respuestas inmunitarias a cualquier epítomo subdominante (celular o humoral) para aumentar la amplitud, magnitud y calidad de las respuestas inmunitarias.

Ejemplo 2. La vacunación con ADN de Env induce respuestas inmunitarias celulares específicas de clados cruzados en ratones

Resultados

Vacunas de ADN con elementos conservados

Se identificó un conjunto de elementos conservados (CE) en la proteína Env del VIH (Figura 9). Este ejemplo describe la identificación de 12 elementos conservados en Env del VIH de 11, 14, 21, 15, 23, 21, 13, 12, 14, 43, 20 y 13 aa de longitud (Figura 10). Cada segmento de CE está separado por enlazadores de 3 aminoácidos de longitud, compuestos de alanina y algunos de los cuales también contienen valina, ácido glutámico, lisina, ácido aspártico, fenilalanina o glicina, diseñados para facilitar el procesamiento de la proteína. Se insertaron genes *Env-CE1* y *Env-CE2* sintéticos de expresión optimizada en un vector de expresión eucariota pCMVkan entre el promotor de CMV humano y la señal de poliA de la hormona de crecimiento bovina. pCMVkan está optimizado para un crecimiento óptimo en bacterias (kanR) y la expresión del inserto en células de mamíferos.

Las regiones para inclusión/exclusión de la vacuna se seleccionaron en función de si las respuestas inmunitarias a dichas regiones estaban asociadas con el control virológico o la falta de control. Se diseñaron y sintetizaron dos versiones de estas proteínas sintéticas (Env-CE1 y Env-CE2), cada una de las cuales está compuesta por 12 elementos conservados que difieren en 0 a 5 aminoácidos por elemento conservado (CE) para maximizar la inclusión de las variantes comúnmente detectadas (Véase la tabla 1). Estos CE se dispusieron colinealmente y se separaron mediante enlazadores de aminoácidos cortos (por ejemplo, 3 aminoácidos) diseñados para facilitar el procesamiento de la proteína y evitar los neoantígenos. Las secuencias codificantes se optimizaron con ARN/codón de acuerdo con el método de optimización de ARN de Pavlakis y Felber (Patentes de Estados Unidos n.º 5.972.596; 5.965.726; 6.174.666; 6.291.664; 6.414.132; 6.794.498) y se diseñaron para utilizar codones alternativos para maximizar la expresión en células humanas. Se colocaron secuencias de expresión optimizada en un vector plásmido de ADN eucariota.

En una realización ilustrativa, se utilizó una combinación de los dos plásmidos para vacunar 4 macacos (Figura 11). Este estudio mostró la inducción de respuestas inmunitarias celulares específicas de CE sólidas (del 0,1 al 0,8 % de los linfocitos T), mediada principalmente por linfocitos T CD8+. (Figura 12). El mapeo fino mostró que 6 de los 12 CE

eran inmunógenos (Figura 15). La vacuna indujo respuestas de linfocitos T de memoria CD8 y CD4 de tipo central y efectora (Figura 13). Esta vacuna también indujo respuestas específicas de CE con una fracción significativa de linfocitos T CD8+ con fenotipo citotóxico (Granzima B+ y CD107a+) (Figura 14). Por lo tanto, la vacuna de ADN Env-CE indujo respuestas inmunitarias celulares con las características deseadas para una vacuna de linfocitos T eficaz.

5 Además de la inmunidad celular, la vacuna de ADN Env-CE también indujo respuestas inmunitarias humorales. Los anticuerpos podrían detectar el inmunógeno así como Env del clado B y del clado C mediante transferencia Western (Figura 22). El anticuerpo también podría detectar la gp120 del VIH mediante ELISA (Figura 20).

10 En cambio, la vacunación de macacos (N = 9) con ADN de Env completo no logró desarrollar respuestas peptídicas lineales específicas de CE en el 50 % de los macacos o indujo respuestas deficientes a solo 1 o 2 CE (Figura 16) y no pudo detectar el inmunógeno en las transferencias Western. Esto indica que los 12 CE de Env no son inmunógenos cuando están presentes con la proteína Env completa, probablemente debido a interferencia inmunológica con otros epítomos y, por lo tanto, no es capaz de inducir respuestas *de novo*.

15 La implementación de una pauta primaria y de refuerzo utilizando la primovacuna con ADN Env-CE seguida del refuerzo con Env inalterado (Figuras 17, 18 y 19), demostró un gran aumento tanto de las respuestas celulares (incluidas las citotóxicas) como de las respuestas humorales. En particular, se encontró un gran aumento de la respuesta peptídica lineal a los CE, que no se encuentra en los macacos vacunados con ADN de Env. Aunque ineficaz a la hora de generar respuestas *de novo* a los CE, el refuerzo con el ADN de Env inalterado aumentó potentemente la inmunidad preexistente. Esta pauta vacunal logró así una alteración eficaz en la jerarquía inmunológica.

20 Por lo tanto, estos datos indican que Env-CE1 y Env-CE2 del VIH son inmunógenos eficaces para inducir respuestas celulares y humorales y cumplen los criterios básicos de inducir respuestas a regiones altamente conservadas de Env que no son vistas por el sistema inmunitario como parte de la Env inalterada (inmunojerarquía alterada) y las respuestas son reactivas entre clados (amplitud entre clados mejorada).

30 Como se muestra en los datos ilustrativos proporcionados en el presente documento, el uso de Env de longitud completa falla o solo induce de manera deficiente respuestas a las regiones conservadas de la proteína. Esto llevó a la hipótesis de que los epítomos de CE dentro de la proteína Env no son inmunógenos debido a un procesamiento y presentación subóptimos o a una jerarquía de inmunodominancia que centra las respuestas en epítomos variables. Para abordar esto experimentalmente, los macacos primovacunados con ADN Env-CE recibieron una vacuna de refuerzo de ADN de Env con la expectativa de que no se produjera un refuerzo de las respuestas de CE (si no hay procesamiento y presentación de péptidos que contienen CE de Env) o de que se produjera un refuerzo de las respuestas de CE (si se puede alterar la jerarquía de inmunodominancia mediante primovacuna con CE). De hecho, se encontró un fuerte aumento de la inmunidad en macacos primovacunados con CE que recibieron un refuerzo con ADN que expresaba Env inalterada.

40 Por tanto, la primovacuna con ADN Env-CE y el refuerzo con plásmido que exprese Env inalterado pueden resolver un obstáculo importante en el desarrollo de una vacuna contra el VIH, lo que demuestra la alteración de la jerarquía de reconocimiento de epítomos y el desarrollo de respuestas inmunitarias a epítomos altamente conservados subdominantes potencialmente protectores. El refuerzo con la vacuna de ADN de Env aumenta la magnitud, amplitud y polifuncionalidad de las respuestas celulares, así como la amplitud de la inmunidad humoral contra Env, dirigiéndose a epítomos dentro de los elementos altamente conservados, así como fuera de Env-CE.

45 **Identificación de regiones con elementos conservados**

50 El éxito de una vacuna con elementos conservados (1) depende de la capacidad de identificar características importantes de las proteínas víricas. Estudios recientes han demostrado que las mutaciones en sitios altamente conservados mostraron diversos grados de impacto en la aptitud, de perjudicial a insignificante (2-5) a creciente (6).

55 Además, se ha demostrado que las mutaciones en sitios que permanecen conservados a lo largo del tiempo tienen un mayor coste de aptitud que las mutaciones de aminoácidos que se volvieron dominantes (y, por lo tanto, se calcula que se conservarán) más tarde en la pandemia (2). De hecho, las cepas de VIH están continuamente siendo impresas por los tipos de HLA humanos que se encuentran en diferentes poblaciones humanas (7,8). Por lo tanto, la conservación de la secuencia puede cambiar a medida que el virus continúa evolucionando y adaptándose a la inmunidad del hospedador, y la conservación de la secuencia contemporánea puede no ser suficiente para identificar sitios con cometidos funcionales o estructurales fundamentales. Por lo tanto, se utilizó la conservación de secuencias, así como otras características, para identificar los elementos conservados que se utilizarán en las presentes vacunas. El grado de conservación necesario para su inclusión como CE de Env fue de al menos un 90 % en todo el grupo M del VIH-1 y, por lo general, al menos un 98 %. Sin embargo, este requisito podría flexibilizarse si hubiera datos disponibles en la bibliografía que asociaran un CTL o un epítomo de anticuerpo, dentro los CE, con control virológico (como lo demuestra la baja carga vírica). Si un epítomo se asoció con falta de control virológico (carga vírica elevada), su secuencia se excluyó de la inclusión en un CE. Los criterios para asignar control virológico o falta de control varían en la bibliografía. Por ejemplo, Mothe (9) y Matthews (10) utilizaron una carga vírica <2.000 moléculas de ARN del VIH por mililitro de plasma sanguíneo para indicar control.

Se utilizaron sitios de alternancia para crear dos versiones de la mayoría de CE. Un sitio de alternancia representa un sitio de aminoácidos en el que la conservación puede ser baja, pero en el que dos aminoácidos combinados representan la gran mayoría de las secuencias de todas las secuencias del grupo M del VIH-1 conocidas, normalmente del 98 al 100 %. Los subtipos B del grupo M del VIH-1, que se encuentran principalmente en América y Europa occidental, y el subtipo C que se encuentra principalmente en Sudáfrica e India, representan la mayoría de los datos de secuencia disponibles y juntos representan >60 % de todas las infecciones por VIH-1. Los sitios de alternancia a menudo representan aa que están altamente conservados en el subtipo B o C, y las secuencias CE1 y CE2 corresponden a los aa más asociados con los subtipos B y C, respectivamente, si el consenso o los restos de la segunda variante más común diferían. Otro medio de coordinar sitios de alternancia es asociar aminoácidos covariantes (11, 12).

Otras características que resultaron en una relajación del requisito del 90 % fueron una asociación con una función conocida o un escape de CTL que dio como resultado una pérdida de aptitud vírica, o una extensión sustancial de la longitud de un CE. Por ejemplo, la región del bucle de unión a CD4 de la proteína Env del VIH corresponde a una región que se une a anticuerpos ampliamente neutralizantes y esta región se incluye como CE10 y CE19. Para incluir esta región, se emplearon siete sitios de alternancia y se incluyó un resto en CE10 sin alternancia que tenía un nivel de conservación de solo el 79 %. En otro ejemplo, un CE muy largo (CE14; 43 aa) se incluyó lo que permitió cinco sitios de alternancia y un resto se conservó solo a un nivel del 84 % en todo el grupo M del VIH-1. Sin embargo, este sitio se conservó en un 97 % y un 99 % en los subtipos B y C del grupo M del VIH-1 y no fue evidente ningún sitio de alternancia obvio. En algunos casos se generaron CE alternativos al relajar aún más los criterios para extender un CE de primera generación en un intento de aumentar su inmunogenia.

A continuación, se probó la capacidad de los modelos computacionales basados en estructuras para asignar sitios de mutaciones que desestabilizarían la estructura de la proteína como un medio para identificar dianas vulnerables para su inclusión en las vacunas de CE. Este enfoque se aplicó por primera vez a la proteína de la cápside del VIH, para la cual se dispone de datos estructurales tridimensionales más completos. Rara vez se encontraron mutaciones desestabilizadoras previstas en una base de datos de 5811 secuencias codificantes de la proteína de la cápside del VIH-1, sin que ninguna esté presente con una frecuencia superior al 2 %. Sin embargo, el 90 % de las variantes con altas puntuaciones de inestabilidad de un conjunto de 184 variantes de la cápside cuya capacidad de replicación o infectividad se ha estudiado *in vitro* tenía estructuras de la cápside anómalas y una infectividad vírica reducida. En función de estas puntuaciones de inestabilidad, se identificaron 45 sitios en la proteína de la cápside propensos a mutaciones desestabilizadoras. Mediante la aplicación de este método a las secuencias de las proteínas de la cápside, se incluyeron 9 sitios adicionales en una segunda generación de CE. Más de la mitad de estos sitios son dianas de uno o más inhibidores conocidos de la función de la cápside (Tabla 3). Las regiones de la cápside enriquecidas con estos sitios también se superponen con péptidos que se ha demostrado que inducen respuestas inmunitarias celulares asociadas con cargas víricas más bajas en individuos infectados.

También se desarrolló una métrica de puntuación conjunta que tiene en cuenta tanto la conservación de la secuencia como la estabilidad de la estructura de las proteínas. Esto funcionó mejor para identificar mutaciones perjudiciales que la conservación de la secuencia o la información de estabilidad de la estructura por sí sola (Tabla 2). El enfoque computacional de estabilidad de secuencia-estructura proporciona así un método adicional para identificar elementos conservados adecuados para su uso en una composición inmunógena que emplea elementos conservados como se describe en el presente documento para polipéptidos del VIH. También se identificaron veintinueve sitios en Env como propensos a mutaciones desestabilizadoras, 11 de los cuales están incluidos en CE del VIH.

También se desarrolló una métrica de puntuación conjunta que tiene en cuenta tanto la conservación de la secuencia como la estabilidad de la estructura de las proteínas. Esto funcionó mejor para identificar mutaciones perjudiciales que la conservación de la secuencia o la información de estabilidad de la estructura por sí sola (Tabla 2). El enfoque computacional de estabilidad de secuencia-estructura proporciona un método adicional para identificar elementos conservados adecuados para su uso en una composición inmunógena que emplea elementos conservados como se describe en el presente documento para polipéptidos del VIH.

Métodos detallados para la predicción de la estabilidad estructural.

Inicio de estructuras tridimensionales. El hexámero de la cápside, PDB ID 3H4E (13), y la forma dímera del dominio carboxiterminal de la cápside, PDB ID 1A43 (14), se utilizaron como estructuras molde para mutaciones en el dominio aminoterminal (NTD; restos 1 a 147) y el dominio carboxiterminal (CTD; restos 148 a 219, incluida la región enlazadora), respectivamente. Si bien la estructura hexámera de la cápside conocida también incluye CTD, que no contiene la interfaz de dimerización CTD, ha demostrado ser fundamental para la estructura y función de la cápside madura (15-17). Por tanto, también se utilizó el dímero CTD (14). Los últimos 13 restos faltaban en el extremo C de las estructuras molde y, por tanto, se excluyeron del análisis.

Se utilizó como molde una estructura cristalina de alta resolución de una Env trimérica de prefusión con los anticuerpos eliminados www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4TVP. Como todavía no se ha dilucidado ninguna estructura de alta resolución de la proteína Env del VIH-1 con todas las secuencias de bucle variables identificadas, es posible que estas predicciones no cubran todas las mutaciones que afectan a la función de las

proteínas.

Mutagénesis por ordenador. Los 19 posibles cambios de aminoácidos se introdujeron por ordenador en cada posición de las proteínas de la cápside y Env del VIH-1 de una en una. También se generaron y utilizaron como conjunto de control estructuras de referencia en las que el aminoácido inicial se reintrodujo en la estructura.

Se aplicaron dos enfoques de modelado de mutaciones por ordenador: Los modelos de estructura fija exploran la conformación de la cadena lateral que mejor se adapta, mientras que los átomos de la cadena principal del resto mutado se mantienen sin cambios desde la posición original en la estructura del molde. Los átomos de la cadena lateral del resto mutado se reemplazaron por los del nuevo aminoácido. La conformación de la cadena lateral que mejor se ajusta se seleccionó utilizando el programa SCWRL versión 4.0 (18). A continuación, el modelo se ejecutó a través de 200 etapas de minimización de energía para eliminar choques atómicos o restricciones internas generadas por el reemplazo de cadenas laterales utilizando el campo de fuerza CHARMM, tal como se implementa en el programa NAMD versión 2.8 (19). Los modelos de estructura principal flexible permiten que los átomos de la cadena principal se muevan junto con las cadenas laterales y se selecciona la combinación que mejor se ajusta. Estos se generaron en el paquete de programas FOLDX (20) usando la función BUILDMODEL con parámetros predeterminados. Este método permite mover las cadenas laterales vecinas para explorar conformaciones alternativas de la estructura principal.

Puntuaciones de la estabilidad de proteínas. Se utilizaron dos tipos de funciones de puntuación de proteínas para evaluar modelos mutantes: La función de puntuación estadística dependiente de la distancia atómica denominada energía proteica discreta optimizada (DOPE, del inglés *Discrete Optimized Protein Energy*) (21) y la función de energía del campo de fuerza empírica denominada función de energía FOLD-X (FOLDEF) (22). DOPE es parte del paquete de modelado de proteínas MODELLER (<http://salilab.org/modeller/>) (23). FOLDEF forma parte del conjunto de programas FOLDX (<http://foldx.crg.es/>) (20). Ambos programas se ejecutaron utilizando parámetros predeterminados.

Conjunto de datos de secuencia y frecuencias de bases de datos de aminoácidos. Las secuencias codificantes completas de Gag y Env del subtipo B del VIH-1 se descargaron de la base de datos del VIH (HIVDB, <http://www.hiv.lanl.gov/>). Se excluyeron cualquier secuencia con hipermutaciones (24), codones de parada temprana, mutaciones por cambio de marco o aminoácidos ambiguos. Se preparó una alineación de secuencia múltiple usando MUSCLE (25) y después se editó manualmente usando Mesquite (26). A continuación, se calculó la frecuencia de la base de datos de cada aminoácido en cada sitio en la alineación final utilizando un *script perl* (<http://indra.mullins.microbiol.washington.edu/perlsript/docs/CountAAFreq.html>).

Para identificar regiones candidatas para el diseño de inmunógenos de vacunas de CTL, se buscaron las secuencias de Env y de la cápside en ventanas deslizantes de 15 aminoácidos, un aminoácido a la vez y se contó el número de sitios propensos a mutaciones desestabilizadoras dentro de cada ventana. Se seleccionó la ventana de tamaño 15 para cubrir la longitud de los epítomos CD4 y CD8 conocidos (27). Si se predijera que menos del 70 % de las posibles sustituciones de aa darían como resultado una estructura estable, entonces se consideró que el sitio era estructuralmente vulnerable. En la medida de lo posible, dados otros criterios, los sitios estructuralmente vulnerables se incluyeron en los CE.

Puntuación de estabilidad de estructura de secuencia compuesta. Se derivó una puntuación compuesta a partir de la frecuencia de la base de datos de mutaciones y la puntuación FOLDEF del modelo de estructura principal flexible mutante. En primer lugar, todas las mutaciones se clasificaron según la frecuencia de la base de datos en orden ascendente. Las mutaciones con la frecuencia de base de datos más baja, es decir, un 0 %, recibieron el rango de frecuencia más baja. A continuación, todas las mutaciones se clasificaron según la puntuación FOLDEF en orden descendente, es decir, los modelos mutantes con la puntuación de estabilidad más elevada recibieron el rango de estabilidad más baja. Para cada mutación, los dos rangos se sumaron para obtener una puntuación compuesta.

El enfoque combinado de secuencia y estructura descrito en el presente documento tiene el potencial de servir como herramienta de detección de dianas para el desarrollo de vacunas y fármacos contra el VIH. Una limitación de este trabajo es que solo se estudiaron cambios de aminoácidos individuales, mientras que pueden surgir mutaciones compensatorias durante la infección vírica que pueden restaurar la estabilidad y función de las proteínas (Chang, 2011; Gong, 2013; Liu, 2014). Además, todos los datos de secuencia, estructura y experimentales utilizados en los presentes análisis se obtuvieron utilizando virus del VIH-1 del subtipo B. Los estudios sobre el efecto de patrones mutacionales más complicados sobre la estabilidad de las proteínas en múltiples orígenes genéticos proporcionarán más información para identificar dianas deseables para las vacunas y terapias contra el VIH. Finalmente, la conservación de aminoácidos también se puede evaluar mediante la ponderación de las sustituciones de aminoácidos específicos por la similitud en las propiedades fisicoquímicas con el aminoácido inicial.

Bibliografía citada en la sección de ejemplos por número:

1 Rolland, M., Nickle, D. C. y Mullins, J. I., Hiv-1 Group M Conserved Elements Vaccine, PLoS Pathogens 3 (11), e157 (2007)

- 2 Rolland, M., Manochewwa, S., Swain, J. V., Lanxon-Cookson, E. C., Kim, M., Westfall, D. H., Larsen, B. B., Gilbert, P. B. y Mullins, J. I., Hiv-1 Conserved-Element Vaccines: Relationship between Sequence Conservation and Replicative Capacity, *J Virol* 87 (10), 5461-7 (2013) PMC3648173
- 5 3 Manochewwa, S., Swain, J. V., Lanxon-Cookson, E., Rolland, M. y Mullins, J. I., Fitness Costs of Mutations at the Hiv-1 Capsid Hexamerization Interface, *PLoS One* 8 (6), e66065 (2013) PMC3681919
- 4 Rihn, S. J., Wilson, S. J., Loman, N. J., Alim, M., Bakker, S. E., Bhella, D., Gifford, R. J., Rixon, F. J. y Bieniasz, P. D., Extreme Genetic Fragility of the Hiv-1 Capsid, *PLoS Pathog* 9 (6), e1003461 (2013)
- 10 5 Tieu, H. V., Rolland, M., Hammer, S. M. y Sobieszczyk, M. E., Translational Research Insights from Completed Hiv Vaccine Efficacy Trials, *J Acquir Immune Defic Syndr* 63, S150-S4 (2013)
- 6 Troyer, R. M., Mcnevin, J., Liu, Y., Zhang, S. C., Krizan, R. W., Abraha, A., Tebit, D. M., Zhao, H., Avila, S., Lobritz, M. A., Mcelrath, M. J., Le Gall, S., Mullins, J. I. y Arts, E. J., Variable Fitness Impact of Hiv-1 Escape Mutations to Cytotoxic T Lymphocyte (CtI) Response, *PLoS Pathog* 5 (4), e1000365 (2009) PMC2659432
- 15 7 Kawashima, Y., Pfafferoth, K., Frater, J., Matthews, P., Payne, R., Addo, M., Gatanaga, H., Fujiwara, M., Hachiya, A., Koizumi, H., Kuse, N., Oka, S., Duda, A., Prendergast, A., Crawford, H., Leslie, A., Brumme, Z., Brumme, C., Allen, T., Brander, C., Kaslow, R., Tang, J., Hunter, E., Allen, S., Mulenga, J., Branch, S., Roach, T., John, M., Mallal, S., Ogwu, A., Shapiro, R., Prado, J. G., Fidler, S., Weber, J., Pybus, O. G., Klenerman, P., Ndung'u, T., Phillips, R., Heckerman, D., Harrigan, P. R., Walker, B. D., Takiguchi, M. y Goulder, P., Adaptation of Hiv-1 to Human Leukocyte Antigen Class I, *Nature* 458 (7238), 641-5 (2009) PMC3148020
- 20 8 Rousseau, C. M., Lockhart, D. W., Listgarten, J., Maley, S. N., Kadie, C., Learn, G. H., Nickle, D. C., Heckerman, D. E., Deng, W., Brander, C., Ndung'u, T., Coovadia, H., Goulder, P. J., Korber, B. T., Walker, B. D. y Mullins, J. I., Rare Hla Drive Additional Hiv Evolution Compared to More Frequent Alleles, *AIDS Res Hum Retroviruses* 25 (3), 297-303 (2009) PMC2693345
- 25 9 Mothe, B., Llano, A., Ibarrodo, J., Zamarreno, J., Schiaulini, M., Miranda, C., Ruiz-Riol, M., Berger, C. T., Herrero, M. J., Palou, E., Plana, M., Rolland, M., Khatri, A., Heckerman, D., Pereyra, F., Walker, B. D., Weiner, D., Paredes, R., Clotet, B., Felber, B. K., Pavlakis, G. N., Mullins, J. I. y Brander, C., CtI Responses of High Functional Avidity and Broad Variant Cross-Reactivity Are Associated with Hiv Control, *PLoS ONE* 7 (1), e29717 (2012) PMC3251596
- 30 10 Matthews, P. C., Listgarten, J., Carlson, J. M., Payne, R., Huang, K. H., Frater, J., Goedhals, D., Steyn, D., Van Vuuren, C., Paioni, P., Jooste, P., Ogwu, A., Shapiro, R., Mncube, Z., Ndung'u, T., Walker, B. D., Heckerman, D. y Goulder, P. J., Co-Operative Additive Effects between Hla Alleles in Control of Hiv-1, *PLoS One* 7 (10), e47799 (2012) PMC3477121
- 35 11 Carlson, J. M., Brumme, Z. L., Rousseau, C. M., Brumme, C. J., Matthews, P., Kadie, C., Mullins, J. I., Walker, B. D., Harrigan, P. R., Goulder, P. J. y Heckerman, D., Phylogenetic Dependency Networks: Inferring Patterns of CtI Escape and Codon Covariation in Hiv-1 Gag, *PLoS Comput Biol* 4 (11), e1000225 (2008) PMC2579584
- 40 12 Rolland, M., Carlson, J. M., Manochewwa, S., Swain, J. V., Lanxon-Cookson, E., Deng, W., Rousseau, C. M., Raugi, D. N., Learn, G. H., Maust, B. S., Coovadia, H., Ndung'u, T., Goulder, P. J., Walker, B. D., Brander, C., Heckerman, D. E. y Mullins, J. I., Amino-Acid Co-Variation in Hiv-1 Gag Subtype C: Hla-Mediated Selection Pressure and Compensatory Dynamics, *PLoS One* 5 (9), e12463 (2010) PMC2931691
- 45 13 Pomillos, O., Ganser-Pomillos, B. K., Kelly, B. N., Hua, Y., Whitby, F. G., Stout, C. D., Sundquist, W. I., Hill, C. P. y Yeager, M., X-Ray Structures of the Hexameric Building Block of the Hiv Capsid, *Cell* 137 (7), 1282-92 (2009) PMC2840706
- 50 14 Worthylake, D. K., Wang, H., Yoo, S., Sundquist, W. I. y Hill, C. P., Structures of the Hiv-1 Capsid Protein Dimerization Domain at 2.6 a Resolution, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55 (Pt 1), 85-92 (1999)
- 55 15 Von Schwedler, U. K., Stray, K. M., Garrus, J. E. y Sundquist, W. I., Functional Surfaces of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capsid Protein, *J Virol* 77 (9), 5439-50 (2003)
- 60 16 Ganser-Pomillos, B. K., Von Schwedler, U. K., Stray, K. M., Aiken, C. y Sundquist, W. I., Assembly Properties of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Ca Protein, *J Virol* 78 (5), 2545-52 (2004) PMC369201
- 65 17 Zhao, G., Perilla, J. R., Yufenyuy, E. L., Meng, X., Chen, B., Ning, J., Ahn, J., Gronenborn, A. M., Schulten, K., Aiken, C. y Zhang, P., Mature Hiv-1 Capsid Structure by Cryo-Electron Microscopy and All-Atom Molecular Dynamics, *Nature* 497 (7451), 643-6 (2013) PMC3729984

- 18 Krivov, G. G., Shapovalov, M. V. y Dunbrack, R. L., Jr., Improved Prediction of Protein Side-Chain Conformations with Scwrl4, *Proteins* 77 (4), 778-95 (2009) PMC2885146
- 5 19 Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kale, L. y Schulten, K., Scalable Molecular Dynamics with Namd, *Journal of computational chemistry* 26 (16), 1781-802 (2005) PMC2486339
- 10 20 Schymkowitz, J., Borg, J., Stricher, F., Nys, R., Rousseau, F. y Serrano, L., The Foldx Web Server: An Online Force Field, *Nucleic Acids Res* 33 (Web Server issue), W382-8 (2005) PMC1160148
- 15 21 Shen, M. Y. y Sali, A., Statistical Potential for Assessment and Prediction of Protein Structures, *Protein Sci* 15 (11), 2507-24 (2006) PMC2242414
- 20 22 Guerois, R., Nielsen, J. E. y Serrano, L., Predicting Changes in the Stability of Proteins and Protein Complexes: A Study of More Than 1000 Mutations, *J Mol Biol* 320 (2), 369-87 (2002)
- 25 23 Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M. Y., Pieper, U. y Sali, A., Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller, *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis... [et al.] Capítulo 5, Unidad 5 6 (2006)*
- 30 24 Rose, P. P. y Korber, B. T., Detecting Hypermutations in Viral Sequences with an Emphasis on G --> a Hypermutation, *Bioinformatics* 16 (4), 400-1 (2000)
- 25 25 Edgar, R. C., Muscle: A Multiple Sequence Alignment Method with Reduced Time and Space Complexity, *BMC Bioinformatics* 5, 113 (2004)
- 26 Maddison, W. P. y Maddison, D. R., *Mesquite: A Modular System for Evolutionary Analysis (2011)*.
- 30 27 Llano, A., Williams, A., Overa, A., Silva-Arrieta, S. y Brander, C. eds., *Best-Characterized Hiv-1 Ctl Epitopes: The 2013 Update, edición de 2013 (Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM. LA-UR 13-27758, Los Alamos, 2013)*.

Tabla 1. Secuencias ilustrativas de elementos conservados de la Env del VIH

Los restos de aminoácidos que difieren entre las dos secuencias de elementos conservados alternativos en cada conjunto están subrayados.

| | |
|-----------|---|
| EnvCE6 | <u>W</u> <u>Y</u> TVYYGVPVW (SEQ ID NO: 1) |
| EnvCE1-1 | HN <u>V</u> WATHACVPTDP (SEQ ID NO: 2) |
| EnvCE1-2 | HN <u>I</u> WATHACVPTDP (SEQ ID NO: 3) |
| EnvCE7-1 | ISLWD <u>Q</u> SLKPCVKLTPLCVTL (SEQ ID NO: 4) |
| EnvCE7-2 | ISLWD <u>E</u> SLKPCVKLTPLCVTL (SEQ ID NO: 5) |
| EnvCE8-1 | FE <u>P</u> IP ^I HYC <u>I</u> PAGFA (SEQ ID NO: 6) |
| EnvCE8-2 | FD <u>P</u> IP ^I HYC <u>A</u> PAG <u>Y</u> <u>A</u> (SEQ ID NO: 7) |
| EnvCE9-1 | VQCTHG <u>I</u> R <u>P</u> VVSTQLLLNGSLAE (SEQ ID NO: 8) |
| EnvCE9-2 | VQCTHG <u>I</u> K <u>P</u> VVSTQLLLNGSLAE (SEQ ID NO: 9) |
| EnvCE10-1 | <u>S</u> GGD <u>P</u> E <u>I</u> <u>V</u> MHSFN <u>C</u> G <u>G</u> EFFYC (SEQ ID NO: 10) |
| EnvCE10-2 | <u>A</u> GGD <u>L</u> E <u>I</u> <u>T</u> HSFN <u>C</u> R <u>G</u> EFFYC (SEQ ID NO: 11) |
| EnvCE11-1 | <u>D</u> NWRSELYKYKW (SEQ ID NO: 12) |
| EnvCE11-2 | <u>N</u> NWRSELYKYKV (SEQ ID NO: 13) |

ES 2 959 642 T3

EnvCE12-1 ARRRVVQREKRA (SEQ ID NO: 14)
EnvCE12-2 AKRRVVEREKRA (SEQ ID NO: 15)

EnvCE13-1 GFLGTAGSTMGAAS (SEQ ID NO: 16)
EnvCE13-2 GFLGAAGSTMGAAS (SEQ ID NO: 17)

EnvCE14-1 LTVQARLLLSGIVQQQNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQAR (SEQ ID NO: 18)
EnvCE14-2 LTVQARQLLSGIVQQQSLLKAIEAQQHMLQLTVWGIKQLQTR (SEQ ID NO: 19)

EnvCE15-1 WLWYIKIFIMIVGGLVGLRI (SEQ ID NO: 20)
EnvCE15-2 WLWYRIFIMIVGGLIGLRI (SEQ ID NO: 21)

EnvCE16-1 RVRKGYSPLSLQT (SEQ ID NO: 22)
EnvCE16-2 RVRQGYSPLSFQT (SEQ ID NO: 23)

EnvCE alternativas:

EnvCE17-1 PIPHYCAPAGFAILKC (SEQ ID NO: 70)
EnvCE17-2 PIPHYCTPAGYAILKC (SEQ ID NO: 71)

EnvCE18-1 NVSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAE (SEQ ID NO: 72)
envCE18-2 NVSSVQCTHGIKPWSTQLLLNGSLAE (SEQ ID NO: 73)

EnvCE19-1 GGDPEIVMHTFNCGGEFFYC (SEQ ID NO: 74)
envCE19-2 GGDLEITTHSFNCRGEFFYC (SEQ ID NO: 75)

EnvCE20-1 CRIKQIINMWQ (SEQ ID NO: 76)
EnvCE20-2 CKIRQIVNRWQ (SEQ ID NO: 77)

EnvCE21-1 GGDMRDNWRSELYKYKV (SEQ ID NO: 78)
EnvCE21-2 GGNMKDNWRSELYKYKV (SEQ ID NO: 79)

envCE22-1 LTVQARLLLSGIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARVLA (SEQ ID NO: 80)
envCE22-2 LTVQARQLLSGIVQQQSNLLKAIEAQQHMLQLTVWGIKQLQTRVLA (SEQ ID NO: 81)

EnvCE23-1 DQQLLGIWGCSGKLIC (SEQ ID NO: 82)
EnvCE23-2 DQQLLGLWGCSGKLIC (SEQ ID NO: 83)

EnvCE24-1 WLWYIKIFIMIVGGLVGLRI (SEQ ID NO: 84)
EnvCE24-2 WLWYIRIFIMIVGGLIGLRI (SEQ ID NO: 85)

SEQ ID NO: 24. Secuencia polipeptídica inmunógena con el elemento conservado 1 de Env que comprende 12 elementos conservados: CE6, CE1-1, CE7-1, CE8-1, CE9-1, CE10-1, CE11-1, CE12-1, CE13-1, CE14-1, CE15-1 y CE16-1. Los aminoácidos enlazadores entre los elementos conservados individuales están subrayados.

5
WVTVYYGVPVWAAVHNWATHACVPTDPAAEISLWDQSLKPCVKLTPLCVTLGAKFEPIPIH
YCTPAGFAGAKVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEAAADSGGDPEIVMHSFNCGGEFFYC**GAKD**
NWRSELYKYKVVA**AKARRRVVQREKRAGAVG**FLGTAGSTMGAASVAVLTVQARLLLSGIVQQ
QNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARAADWLWYIKIFIMIVGGLVGLRIA**AAFRVRK**GYSP
LSLQT

SEQ ID NO: 25. Secuencia polipeptídica inmunógena con el elemento conservado 2 de Env que comprende 12 elementos conservados: CE6, CE1-2, CE7-2, CE8-2, CE9-2, CE10-2, CE11-2, CE12-2, CE13-2, CE14-2, CE15-2 y CE16-2. Los aminoácidos enlazadores entre los elementos conservados individuales están subrayados.

10
WVTVYYGVPVWAAVHNIWATHACVPTDPAAEISLWDESLKPCVKLTPLCVTLGAKFDPIPIH
YCAPAGYAGAKVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEAAADAGGDLEITTHSFNCRGEFFYC**GAKN**
NWRSELYKYKVVA**AKARRVVEREKRAGAVG**FLGAAGSTMGAASVAVLTVQARQLLSGIVQQ
QSNLLKAIEAQQHMLQLTVWGIKQLQTRAADWLWYIRIFIMIVGGLIGLRIA**AAFRVRQ**GYSP
LSFQT

15 SEQ ID NO: 69

Figura 25 Secuencia de aminoácidos de la construcción con CE que contiene Env-CE1_V1V2

MRVTEIRKSYQHWWRWGIMLLGILMICNAEEKLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCAS
DRKAYDTEVHNWATHACVPTDPNPQEVVELKNVTENFNMWKNMVEQMHEDIISL
WDQSLKPCVKLTPLCVTLNCTDLRNATNGNDTNTTSSSRGMVGGGEMKNCSEFNITT
NIRGKVQKEYALFYKLDIAPIDNNSNNRYRLISCGAKFEPIPIHYCTPAGFAGAKVQC
THGIRPVVSTQLLLNGSLAEAAADSGGDPEIVMHSFNCGGEFFYC**GAKDNWRSELYK**
YKVVA**AKARRRVVQREKRAGAVG**FLGTAGSTMGAASVAVLTVQARLLLSGIVQQQ
NLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARAADWLWYIKIFIMIVGGLVGLRIA**AAFRVRK**
GYSPLSLQT

20 Disposiciones alternativas de EnvCE (orden Env CE):

EnvCE6, EnvCE1-1, EnvCE7-1, EnvCE17-1, EnvCE18-1, EnvCE19-1, EnvCE20-1, EnvCE21-1, EnvCE12-1,
EnvCE13-1, EnvCE22-1, EnvCE23-1, EnvCE24-1, EnvCE16-1 y

25 EnvCE6, EnvCE1-2, EnvCE7-2, EnvCE17-2, EnvCE18-2, EnvCE19-2, EnvCE20-2, EnvCE21-2, EnvCE12-2,
EnvCE13-2, EnvCE22-2, EnvCE23-2, EnvCE24-2, EnvCE16-2

Tabla 2. Secuencias ilustrativas de elementos conservados de Gag del VIH:

Elementos conservados de Gag de p24 para la vacuna p24CE1 ("también denominada "p24 CE1"):

SEQ ID NO: 26 elemento conservado 1 (CE1)

ISPRTLNAWVKV

SEQ ID NO: 27 elemento conservado 2 (CE2)

VIPMFSALSEGATPQDLN

SEQ ID NO: 28 elemento conservado 3 (CE3)

VGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDR

SEQ ID NO: 29 elemento conservado 4 (CE4)

PRGSDIAGTTSTLQEIQIW

SEQ ID NO: 30 elemento conservado 5 (CE5)

KRWILGLNKIVRMYSPTSI

SEQ ID NO: 31 elemento conservado 6 (CE6)

YVDRFYKTLRAEQA

SEQ ID NO: 32 elemento conservado 7 (CE7)

LEEMMTACQGVGGPGHK

Elementos conservados de Gag de p24 para la vacuna p24CE2 ("también denominada p24 CE2"):

SEQ ID NO: 33 elemento conservado 1 (CE1)

LSPRTLNAWKV

SEQ ID NO: 34 elemento conservado 2 (CE2)

VIPMFTALSEGATPQDLN

SEQ ID NO: 35 elemento conservado 3 (CE3)

VGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDR

SEQ ID NO: 36 elemento conservado 4 (CE4)

PRGSDIAGTTSTLQEIQIAW

SEQ ID NO: 37 elemento conservado 5 (CE5)

KRWILGLNKIVRMYSVSI

SEQ ID NO: 38 elemento conservado 6 (CE6)

YVDRFFKTLRAEQA

SEQ ID NO: 39 elemento conservado 7 (CE7)

LEEMMTACQGVGGP SHK

SEQ ID NO: 40 secuencia de aminoácidos del polipéptido con CE1 de Gag de p24:

VIPMFSALSEGATPQDLNAAVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAG
TTSTLQEQIGWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQAAGLEEM
MTACQGVGGPGHKA AISPRTLNAWVKV

SEQ ID NO: 41 secuencia de aminoácidos del polipéptido con CE2 de Gag de p24:

VIPMFTALSEGATPQDLNAAVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAG
TTSTLQEQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVDRFFKTLRAEQAAGLEEM
MTACQGVGGPSHKA ALSPRTLNAWVKV

SEQ ID NO: 42 secuencia polipeptídica de p24CE1 que incluye un péptido señal de GM-CSF

MWLQSLLLLGTVACSSIVIPMFSALSEGATPQDLNAAVGGHQAAMQMLKDTINEEA
AEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEQIGWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVD
RFYKTLRAEQAAGLEEMMTACQGVGGPGHKA AISPRTLNAWVKV

SEQ ID NO: 43 secuencia polipeptídica de p24CE2 que incluye un péptido señal de GM-CSF

MWLQSLLLLGTVACSSIVIPMFTALSEGATPQDLNAAVGGHQAAMQMLKETINEEA
AEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVD
RFFKTLRAEQAAGLEEMMTACQGVGGPSHKA ALSPRTLNAWVKV

SEQ ID NO: 44 LAMP-p24CE1 (p24CE1 subrayado)

MAPRSARRPLLLLLLLLLLGLMHCA SAAMFMVKNGNGTACIMANFSAAFSVNYDT
KSGPKNMTLDLPSDATVVLNRSSCGKENTS DPSLVIAFGRGHTLTLNFTRNATRYSV
QLMSFVYNLSDTHLFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVTL
HDATIQA YLSNSSFSRGETRCEQDRPSPTTAPPAPSPSPSPVPKSPSVDKYNVSGTNG
TCLLASMGLQLNLT YERKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAHLVTLELHSEGTTVL
LFQFGMNASSSRFFLQGIQLNTILPDARDPAFKAANGSLRALQATVGNSYKCNAEEH
VRVTKAFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENSLEDI VIPMFSALSEGATPQ
DLNAAVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEQIGWAAA
KRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQAAGLEEMMTACQGVGGPGHK
AAISPRTLNAWVKV VGSEFTLIPIAVGGALAGLVLIVLIA YLVGRKRSHAGYQTI

SEQ ID NO: 45 Fusión LAMP-p24CE2 (p24CE2 subrayado)

MAPRSARRPLLLLLLLLLGLMHCSAAMFMVKNNGTACIMANFSAAFSVNYDT
KSGPKNMTLDLPDATVVLNRSSCGKENTSDPSLVIAFGRGHTLTLNFTRNATRYSV
QLMSFVYNLSDTHLFPNASSKEIKTVESITDIRADIDKKYRCVSGTQVHMNNVTVL
HDATIQA YLSNSSFSRGETRCEQDRPSPTTAPPAPSPSPSPVPKSPSVDKYNVSGTNG
TCLLASMGLQLNLT YERKDNTTVTRLLNINPNKTSASGSCGAHLVTLELHSEGTTVL
LFQFGMNASSSRFFLQGIQLNTILPDARPAFKAANGSLRALQATVGNYSYKCAEEH
VRVTKAFSVNIFKVWVQAFKVEGGQFGSVEECLLDENSLEDIVIPMFTALSEGATPO
DLNAAVGGHQAAAMQMLKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEQIAWAAA
KRWIILGLNKIVRMYS PVSIAAKYVDRFFKTLRAEQAAGLEEMMTACQGVGGPSHK
AALSPRTLNAWVKV GSEFTLPIAVGGALAGLV LIVLIA YLVGRKRSHAGYQTI

SEQ ID NO: 46 SP-p24CE2 (p24CE1 subrayado)

MWLQSLLLLGTV[^]ACSISV[˘]IPMFTALSEGATPO[˘]DLNAAVGGHQAAAMQMLKETINEEA
AEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYS PVSIAAKYVD
RFFKTLRAEQAAGLEEMMTACQGVGGPSHKAALSPRTLNAWVKV

SEQ ID NO: 47 MCP3-p24CE1 (p24CE1 subrayado)

MWKPMSPSNMKASAALLCLLLTAAAFSPQGLAQPVGINTSTTCCYRFINKKIPKQR
LESYRRTTSSHC PREAVIFKTKLDKEICADPTQKWVQDFMKHLDKKTQTPKL
VIPMFALS EGATPODLNAAVGGHQAAAMQMLKDTINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAG
TTSTLQEQIGWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQAAGLEEM
MTACQGVGGPGHKAALSPRTLNAWVKV

SEQ ID NO: 48 MCP3-p24CE2 (p24CE2 está subrayado)

MWKPMSPSNMKASAALLCLLLTAAAFSPQGLAQPVGINTSTTCCYRFINKKIPKQR
LESYRRTTSSHC PREAVIFKTKLDKEICADPTQKWVQDFMKHLDKKTQTPKL
VIPMFTAL SEGATPODLNAAVGGHQAAAMQMLKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAG
TTSTLQEQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYS PVSIAAKYVDRFFKTLRAEQAAGLEEM
MTACQGVGGPSHKAALSPRTLNAWVKV

SEQ ID NO: 49 polipéptido con CE alternativo SP-p24CE1c (p24CE1c subrayado). Incluye el péptido señal de GM-CSF, CE1 y CE2 sustituidos por CE8 y CE9, respectivamente (en relación con CE de p24 "Núcleo 1"); carece de CE7; dispuestos en la configuración de elementos conservados: CE 8-9-3-4-5-6

MWLQSLLLLGTVACSISQGMVHQ[˘]AI SPRTLNAWVKVLAKEEKAFSPEVIPMFALS
EGATPODLNAAKVGGHQAAMQMLKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEQ
IGWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPTSIAAKYVDRFYKTLRAEQADYKDDDDKL

SEQ ID NO: 50 Elemento conservado 8 (CE8) de gag

QGQMVHQ[˘]AI SPRTLNAWVKV

ES 2 959 642 T3

SEQ ID NO: 51 Elemento conservado 9 (CE9) de gag

EEKAFSPEVIPMFSAALSEGATPQDLN

SEQ ID NO: 52 Polipéptido con CE alternativos SP-p24CE2c, p24CE2c subrayado

MWLQSLLLLGTVACSSISQGMVHQALSPRTLNAWVKVLAKEEKGFNPEVIPMFTAL
SEGATPQDLNAAKVGGHQAAMQMLKDTINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQ
EQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPIAAKYVDRFFKTLRAEQA

SEQ ID NO: 53 Construcción polipeptídica con CE alternativos SP-p24CE2d; en orden CE9-3-4-5-6-8

MWLQSLLLLGTVACSSISEEKGFNPEVIPMFTALSEGATPQDLNAAKVGGHQAAMQM
LKDTINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEQIAWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPI
VSIAAKYVDRFFKTLRAEQAALQGQMVHQALSPRTLNAWVKV

SEQ ID NO: 54 Construcción polipeptídica con CE alternativos SP-24CE1d; en orden CE9-3-4-5-6-8

MWLQSLLLLGTVACSSISEEKAFSPEVIPMFSAALSEGATPQDLNAAKVGGHQAAMQM
LKETINEEAAEWDRAAAEPRGSDIAGTTSTLQEQIGWAAAKRWIILGLNKIVRMYSPI
TSIAAKYVDRFYKTLRAEQAALQGQMVHQALSPRTLNAWVKV

p24CE1d tiene 6 CE (es idéntico a p24CE1c excepto por la disposición de los CE dentro de la proteína)

El péptido señal de GM-CSF, CE1 y C2 reemplazados por CE8 y CE9 respectivamente, carece de CE7 y tiene los CE dispuestos en la configuración CE9-3-4-5-6-8

5 **SEQ ID NO: 55** Elemento conservado 8 de Gag (variante CE8 para construcciones CE2)

QGQMVHQALSPRTLNAWVKV

SEQ ID NO: 56 Elemento conservado 9 (CE9) de gag

EEKGFNPEVIPMFTALSEGATPQDLN

10 Las diferencias entre los CE para los polipéptidos con CE de p24 y los polipéptidos p24CE variantes son un aminoácido por CE, excepto CE9, que se diferencia en 3 aminoácidos

Elementos conservados alternativos de Gag de p24:

p24CE8-1 QPISPRTLNAWVKV (SEQ ID NO: 57)

p24CE8-2 QALSPRTLNAWVKV (SEQ ID NO: 58)

p24CE9-1 EEKAFSPEVIPMFSAALSEGATPQDLNTMLN (SEQ ID NO: 59)

p24CE9-2 EEKGFNPEVIPMFTALSEGATPQDLNMMLN (SEQ ID NO: 60)

p24CE10-1 PRGSDIAGTTSTLQEQIGWMT (SEQ ID NO: 61)

p24CE10-2 PRGSDIAGTTSTLQEQIAWMT (SEQ ID NO: 62)

p24CE11-1 SILDIRQGPKEPFRDYVDRF (SEQ ID NO: 63)

p24CE11-2 SILDIRQGPKEPFRDYVDRF (SEQ ID NO: 64)

p24CE12-1 QNSNPCKTILKALG (SEQ ID NO: 65)

p24CE12-2 QNANPDCKTILKALG (SEQ ID NO: 66)

p24CE13-1 LEEMMTACQGVGGPGHKARILAEAM (SEQ ID NO: 67)

p24CE13-2 LEEMMTACQGVGGPSHKARVLAEM (SEQ ID NO: 68)

Disposiciones alternativas de p24CE:

P24CE8-1, p24CE9-1, p24CE3-1, p24CE10-1, p24CE5-1, p24CE11-1, p24CE6-1, p24CE12-1, p24CE13-1

P24CE8-2, p24CE9-2, p24CE3-2, p24CE10-2, p24CE5-2, p24CE11-2, p24CE6-2, p24CE12-2, p24CE13-2

Tabla 3. Precisión del uso de la frecuencia de mutación o el cambio en la estabilidad estructural para predecir la infectividad vírica en forma de clasificación binaria

| Factor pronóstico | Sensibilidad ^d | Especificidad ^e | Precisión ^f | Exactitud ^g |
|---|---------------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|
| Frecuencia de mutación ^a | 59,5 % | 70,0 % | 67,10 % | 64,10 % |
| Estabilidad de los modelos de referencia ^b | 72,34 % | 77,78 % | 77,30 % | 75,00 % |
| Puntuación compuesta ^c | 80,00 % | 79,57 % | 78,16 % | 79,78 % |

^a Se prevé que las mutaciones con una frecuencia de base de datos del 0,2 % o menos darán lugar a virus no infecciosos
^b Se predice que los mutantes con una estabilidad estructural superior a la de los modelos de referencia darán lugar a virus no infecciosos
^c Se predice que los mutantes con una puntuación compuesta (suma de rangos de frecuencia y puntuaciones de estabilidad) superior a 175 darán lugar a virus no infecciosos
^d Sensibilidad = (Verdadero positivo)/(Verdadero positivo + Falso negativo)
^e Especificidad = (Verdadero negativo)/(Verdadero negativo + Falso positivo)
^f Precisión = (Verdadero positivo)/(Verdadero positivo + Falso positivo)
^g Exactitud = (Verdadero positivo + Verdadero negativo)/(Verdadero positivo + Verdadero negativo + Falso positivo + Falso negativo)

Tabla 4. Sitios de aminoácidos dentro de la CA del VIH-1 propensos a mutaciones desestabilizadoras

| Sitio (HXB2) | aa consenso | Frecuencia | Elemento estructural y ubicación en hexámero de cápside y/o dímero CTD | Superficie de accesibilidad al disolvente (A ²) | Sitio de unión de los inhibidores de CA |
|--------------|-------------|------------|--|---|---|
| 2 | ILE | 0,98 | Horquilla β | 10,22 | Ninguno |
| 8 | GLY | 0,99 | Horquilla β | 40,98 | Ninguno |
| 20 | LEU | 0,99 | Hélice 1; interfaz de hexamerización de la cápside (NTD-NTD) | 2,1 | Ninguno |
| 23 | TRP | 0,99 | Hélice 1 | 2,81 | CAP-1, BD3, BM4 Inhibidor 3 |
| 32 | PHE | 0,99 | Giro β en la región del bucle entre las hélices 1 y 2 | 5,97 | CAP-1; BD3, BM4; Inhibidor 3 Series de benzodiazepinas 33 |
| 36 | VAL | 0,97 | Hélice 2 | 0,65 | I-XW-053; BD3 Inhibidor 3 |
| 37 | ILE | 0,97 | Hélice 2 | 17,74 | Inhibidor 3 |
| 40 | PHE | 0,99 | Hélice 2 | 0 | Inhibidor 3 |
| 43 | LEU | 0,98 | Hélice 2; interfaz de hexamerización de la cápside (NTD-NTD) | 13,74 | Ninguno |
| 49 | PRO | 0,99 | Hélice 3 | 0 | Ninguno |
| 52 | LEU | 0,99 | Hélice 3 | 0,02 | Ninguno |
| 55 | MET | 0,99 | Hélice 3 | 0,69 | Ninguno |

(continuación)

| Sitio (HXB2) | aa consenso | Frecuencia | Elemento estructural y ubicación en hexámero de cápside y/o dímero CTD | Superficie de accesibilidad al disolvente (Å ²) | Sitio de unión de los inhibidores de CA |
|--------------|-------------|------------|--|---|---|
| 56 | LEU | 0,99 | Hélice 3 | 12,75 | Inhibidor 3 {ref} |
| 65 | ALA | 0,99 | Hélice 4 | 0 | CAP-1; Inhibidor 3; Series de benzodiazepinas 33 |
| 66 | MET | 0,99 | Hélice 4 | 13,09 | Inhibidor 3; PF-3450074 |
| 69 | LEU | 0,99 | Hélice 4 | 2,91 | Inhibidor 3 |
| 73 | ILE | 0,99 | Hélice 4 | 13,8 | PF-3450074; |
| 80 | TRP | 0,99 | Hélice 4 | 40,65 | Inhibidor 4 |
| 99 | PRO | 0,99 | Bucle entre la hélice 4 y 5 | 8,6 | Ninguno |
| 101 | GLY | 0,99 | Hélice 5 | 0,1 | Ninguno |
| 104 | ILE | 0,99 | Hélice 5 | 0 | Ninguno |
| 106 | GLY | 0,99 | Giro β en la región del bucle entre las hélices 5 y 6 | 18,65 | Ninguno |
| 109 | SER | 0,99 | Giro β en la región del bucle entre las hélices 5 y 6 | 13,19 | Ninguno |
| 111 | LEU | 0,99 | Hélice 6 | 53,08 | Ninguno |
| 117 | TRP | 0,99 | Hélice 6 | 0,24 | Inhibidor 4; |
| 126 | VAL | 0,99 | Hélice 7 | 0 | Ninguno |
| 133 | TRP | 0,99 | Hélice 7 | 10,88 | Ninguno |
| 134 | ILE | 0,99 | Hélice 7 | 0 | Inhibidor 3 |
| 138 | LEU | 0,98 | Hélice 7 | 0,66 | Inhibidor 3 |
| 141 | ILE | 0,99 | Hélice 7 | 0,22 | CAP-1; Inhibidor 3 |
| 142 | VAL | 0,99 | Hélice 7 | 0,84 | Inhibidor 3 |
| 144 | MET | 0,99 | Hélice 7 | 20,6 | Ninguno |
| 150 | ILE | 0,99 | Región enlazadora entre NTD y CTD; Interfaz de dimerización CTD | 23,25 | CAC1; Péptido CP4 |
| 153 | ILE | 0,99 | Región enlazadora entre NTD y CTD; Interfaz de dimerización CTD | 11,75 | Ninguno |
| 161 | PHE | 0,99 | Hélice 8; MHR | 6,88 | Ninguno |
| 165 | VAL | 0,99 | Hélice 8; MHR; Interfaz de hexamerización de la cápside (NTD-CTD) | 0 | I-XW-053; Serie de compuestos CAI; H8; Péptidos NYAD |
| 168 | PHE | 0,99 | Hélice 8; MHR | 0,12 | I-XW-053; Péptidos NYAD |
| 169 | TYR | 0,99 | Hélice 8; MHR; Interfaz de hexamerización de la cápside (NTD-CTD) | 30,73 | I-XW-053; Péptido CAI; Serie de compuestos CAI; Péptidos NYAD |
| 172 | LEU | 0,99 | Hélice 8; MHR; Interfaz de dimerización CTD | 5,4 | I-XW-053; CAC1, H8; Péptidos NYAD |
| 189 | LEU | 0,99 | Hélice 9; Interfaz de dimerización CTD | 24,94 | CAC1 |
| 198 | CYS | 0,99 | Hélice 10 | 12,6 | CAC1 |
| 202 | LEU | 0,99 | Hélice 10 | 7,67 | CAC1 |

ES 2 959 642 T3

(continuación)

| Sitio (HXB2) | aa consenso | Frecuencia | Elemento estructural y ubicación en hexámero de cápside y/o dímero CTD | Superficie de accesibilidad al disolvente (Å ²) | Sitio de unión de los inhibidores de CA |
|--------------|-------------|------------|--|---|---|
| 205 | LEU | 0,98 | Hélice 10 | 77,49 | Ninguno |
| 206 | GLY | 0,99 | Giro β en la región del bucle entre las hélices 10 y 11 | 28,12 | Ninguno |
| 211 | LEU | 0,99 | Hélice 11; Interfaz de hexamerización de la cápside (NTD-CTD) | 4,46 | Serie de compuestos CAI; CAC1; Péptidos NYAD; Péptido CP4 |

REIVINDICACIONES

1. Al menos una construcción de ácido nucleico que codifica un primer polipéptido con elementos conservados, una segunda construcción de ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido con elementos conservados y una construcción de ácido nucleico que codifica una proteína de interés de longitud completa o sustancialmente de longitud completa, para su uso en un método para inducir una respuesta inmunitaria a la proteína de interés, en donde la proteína de interés es Gag del VIH-1 o Env del VIH-1 y en donde la proteína sustancialmente de longitud completa es una región de la proteína Gag del VIH-1 o Env del VIH-1 que incluye todos los elementos conservados, y el método comprende:
- provocar una respuesta inmunitaria a la proteína de interés, en donde la provocación comprende administrar; la al menos una construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados, en donde los elementos conservados provienen de la proteína de interés y el polipéptido comprende al menos tres elementos conservados, cada uno de 8 a 50 aminoácidos de longitud donde los elementos conservados están unidos mediante enlazadores peptídicos que no se encuentran de manera natural en la proteína de interés; y la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados que comprende al menos una variante de un elemento conservado contenido en el primer polipéptido con elementos conservados, en donde la variante en el segundo polipéptido difiere del primer polipéptido en 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, con la condición de que una construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de longitud completa, o una región sustancialmente de longitud completa de la misma, no se administra en la etapa de primovacunación; y reforzar la respuesta inmunitaria a la proteína de interés, en donde el refuerzo comprende administrar conjuntamente (i) la construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de interés de longitud completa, o la proteína de interés sustancialmente de longitud completa, y (ii) la construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados y la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados.
2. La al menos una construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados, la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados y la construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de interés de longitud completa o sustancialmente de longitud completa, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa de refuerzo comprende administrar el ácido nucleico de (i) y el ácido nucleico de (ii) al mismo tiempo, opcionalmente mediante electroporación *in vivo*.
3. La al menos una construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados, la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados y la construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de interés de longitud completa o sustancialmente de longitud completa, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la primera y segunda construcción de ácido nucleico con elementos conservados se administran de manera secuencial; o se administran de manera simultánea.
4. La al menos una construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados, la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados y la construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de interés de longitud completa o sustancialmente de longitud completa, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, en donde la proteína de interés es Gag del VIH-1 y los elementos conservados son de p24^{gag} del VIH-1.
5. La al menos una construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados, la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados y la construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de interés de longitud completa o sustancialmente de longitud completa, para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde:
- (a) un polipéptido con elementos conservados comprende elementos conservados, cada uno de los cuales tiene una secuencia establecida en las SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 31 y 32; y un segundo polipéptido con elementos conservados comprende elementos conservados, cada uno de los cuales tiene una secuencia establecida en las SEQ ID NO: 33, 34, 35, 36, 37, 38 y 39; o
- (b) un polipéptido con elementos conservados comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40 y un segundo polipéptido con elementos conservados comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41; o
- (c) un polipéptido con elementos conservados comprende elementos conservados, cada uno de los cuales tiene una secuencia establecida en las SEQ ID NO: 57, 59, 61, 63, 65 y 67; y un segundo polipéptido con elementos conservados comprende elementos conservados, cada uno de los cuales tiene una secuencia establecida en las SEQ ID NO: 58, 60, 62, 64, 66 y 68.
6. La al menos una construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados, la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados y la construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de interés de longitud completa o sustancialmente de longitud completa, para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde los polipéptidos con elementos conservados codificados por la primera y segunda construcción de ácido nucleico con elementos conservados de ácido nucleico de Gag se fusionan cada uno a un péptido señal de GM-CSF.

7. La al menos una construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados, la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados y la construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de interés de longitud completa o sustancialmente de longitud completa, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, en donde la proteína de interés es una secuencia de Env del VIH-1.
8. La al menos una construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados, la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados y la construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de interés de longitud completa o sustancialmente de longitud completa, para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde:
- (a) un polipéptido con elementos conservados comprende al menos 12 elementos conservados de diferentes regiones conservadas de Env del grupo M del VIH-1 y cada uno de los elementos conservados tiene una secuencia de elementos conservados que se muestra en la tabla 1; o
 - (b) un polipéptido con elementos conservados comprende elementos conservados, cada uno de los cuales tiene una secuencia establecida en las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22; y un segundo polipéptido con elementos conservados comprende elementos conservados, cada uno de los cuales tiene una secuencia establecida en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 23; o
 - (c) un polipéptido con elementos conservados de Env comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 y el segundo polipéptido con elementos conservados de Env comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25.
9. La al menos una construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados, la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados y la construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de interés de longitud completa o sustancialmente de longitud completa, para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde los polipéptidos con elementos conservados codificados por la primera y segunda construcción de ácido nucleico con elementos conservados de ácido nucleico de Env se fusionan cada uno a un péptido señal de GM-CSF.
10. La al menos una construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados, la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados y la construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de interés de longitud completa o sustancialmente de longitud completa, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la primera y segunda construcción de ácido nucleico con elementos conservados de ácido nucleico están contenidas en el mismo vector; o la primera y segunda construcción de ácido nucleico están contenidas en diferentes vectores.
11. La al menos una construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados, la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados y la construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de interés de longitud completa o sustancialmente de longitud completa, para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde
- el refuerzo se realiza al menos dos semanas después de la etapa de primovacunación; y/o
 - la etapa de primovacunación comprende dos o tres administraciones del uno o más ácidos nucleicos con elementos conservados, cada una separada por al menos 2 semanas, y la etapa de refuerzo comprende dos administraciones conjuntas, cada una separada por al menos 2 semanas.
12. Un vector de expresión que codifica CE que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 40 fusionada en el extremo N a un péptido señal de GM-CSF humano y una secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID NO: 41 fusionada en el extremo N a un péptido señal de GM-CSF humano, y un vector de expresión que codifica p55^{gag} de longitud completa del VIH-1 o p55^{gag} sustancialmente de longitud completa del VIH-1, para su uso en el método de la reivindicación 1 para inducir una respuesta inmunitaria a Gag del VIH en un sujeto, en donde la proteína sustancialmente de longitud completa es una región de la proteína que incluye todos los elementos conservados, y el método comprende:
- provocar una respuesta inmunitaria a Gag del VIH, en donde la primovacunación comprende administrar al sujeto el vector de expresión que codifica CE; en donde al sujeto no se le administra conjuntamente o no se le ha administrado previamente una construcción de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido Gag del VIH de longitud completa o sustancialmente de longitud completa;
 - reforzar una respuesta inmunitaria a Gag del VIH, en donde el refuerzo comprende administrar conjuntamente el vector de expresión que codifica CE con el vector de expresión que codifica p55^{gag} del VIH-1 de longitud completa, o p55^{gag} del VIH-1 sustancialmente de longitud completa; opcionalmente en donde
 - la etapa de refuerzo se realiza dos meses después de la etapa de primovacunación; y/o
 - el método comprende dos o tres etapas de primovacunación, cada una separada por dos meses, y dos etapas de refuerzo, cada una separada por dos meses.
13. La al menos una construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados, la

- construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados y la construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de interés de longitud completa o sustancialmente de longitud completa, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 para inducir una respuesta inmunitaria a Env del VIH, en donde el ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados o el ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados codifica un polipéptido inmunógeno con elementos conservados de Env del VIH que comprende:
- 5
- (a) al menos cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez u once elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22; en donde los elementos conservados están separados por enlazadores de 1 a 5 aminoácidos de longitud; o
- 10
- (b) los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20 y SEQ ID NO: 22; o
- 15
- (c) al menos cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez u once elementos conservados seleccionados de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23; en donde los elementos conservados están separados por enlazadores de 1 a 5 aminoácidos de longitud; o
- 20
- (d) los elementos conservados de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 23; o
- (e) SEQ ID NO: 24; o
- (f) SEQ ID NO: 25.
- 25
14. La al menos una construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados, la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados y la construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de interés de longitud completa o sustancialmente de longitud completa, para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el polipéptido con elementos conservados de Env del VIH comprende además una secuencia de región variable V1V2 y/o el polipéptido con elementos conservados de Env del VIH comprende un péptido señal.
- 30
15. La al menos una construcción de ácido nucleico que codifica el primer polipéptido con elementos conservados, la construcción de ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido con elementos conservados y la construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de interés de longitud completa o sustancialmente de longitud completa, para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el péptido señal es el péptido señal de GM-CSF.
- 35

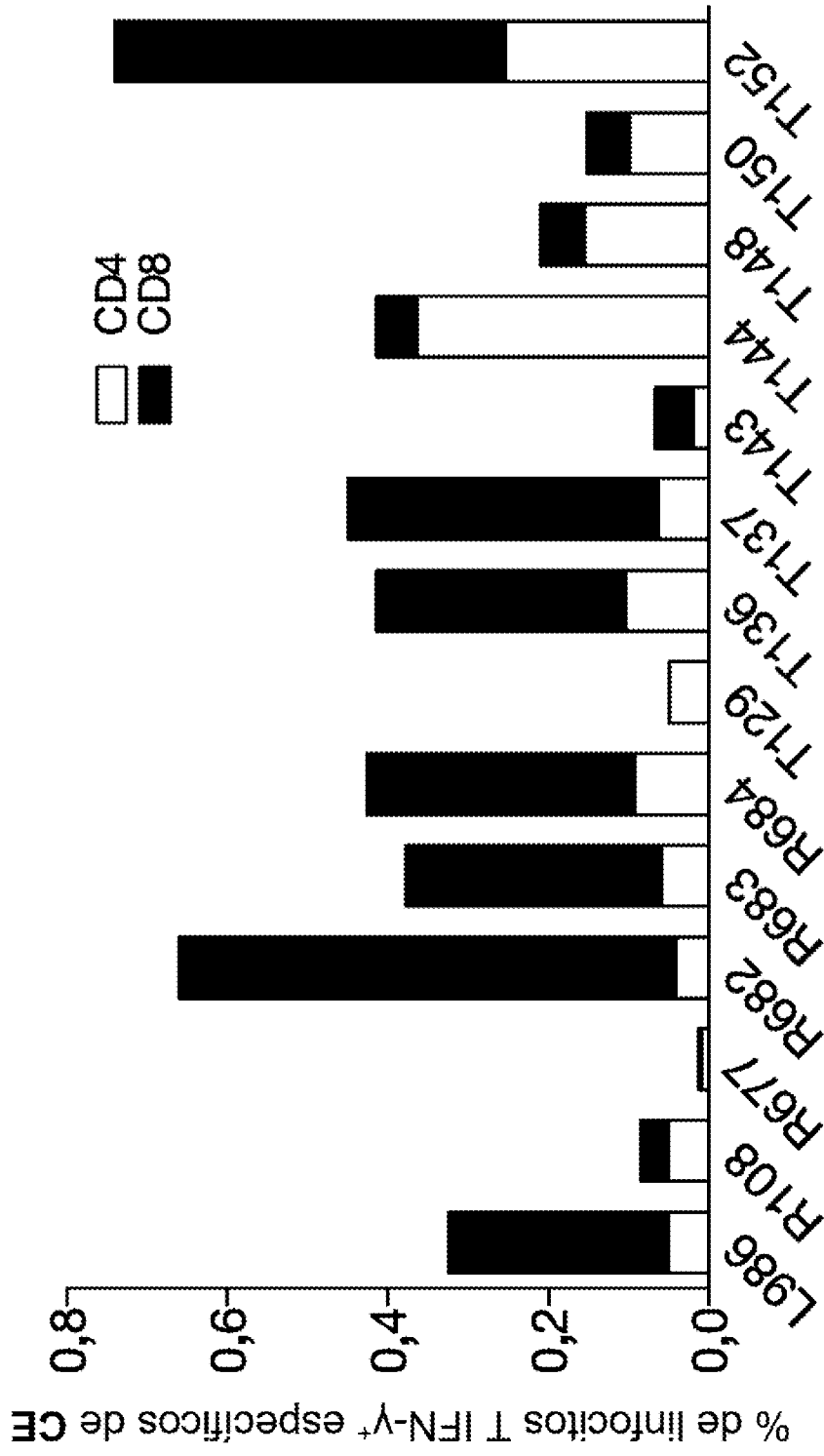


Figura 2

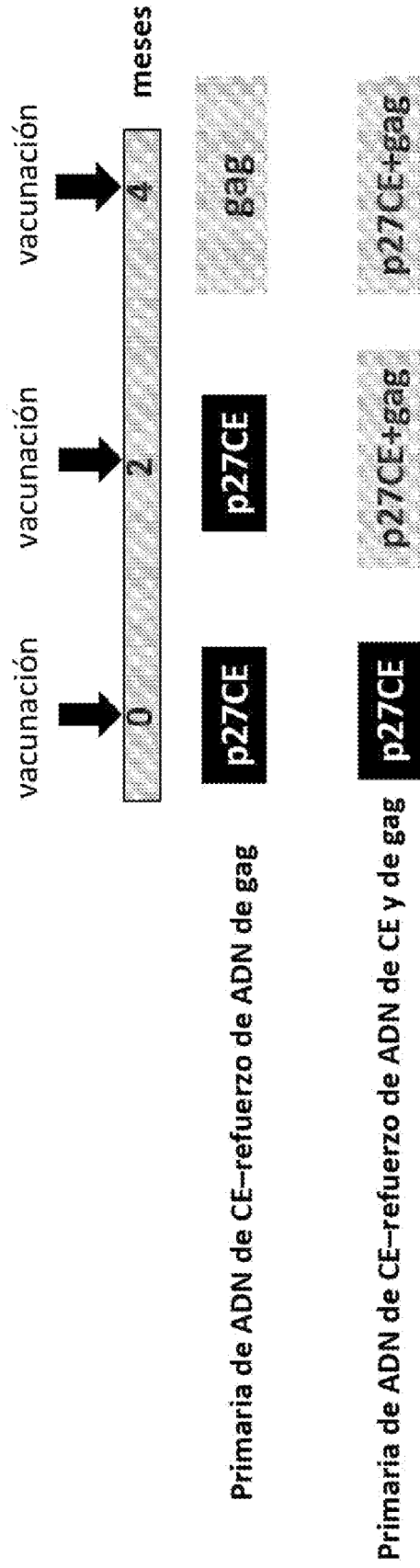
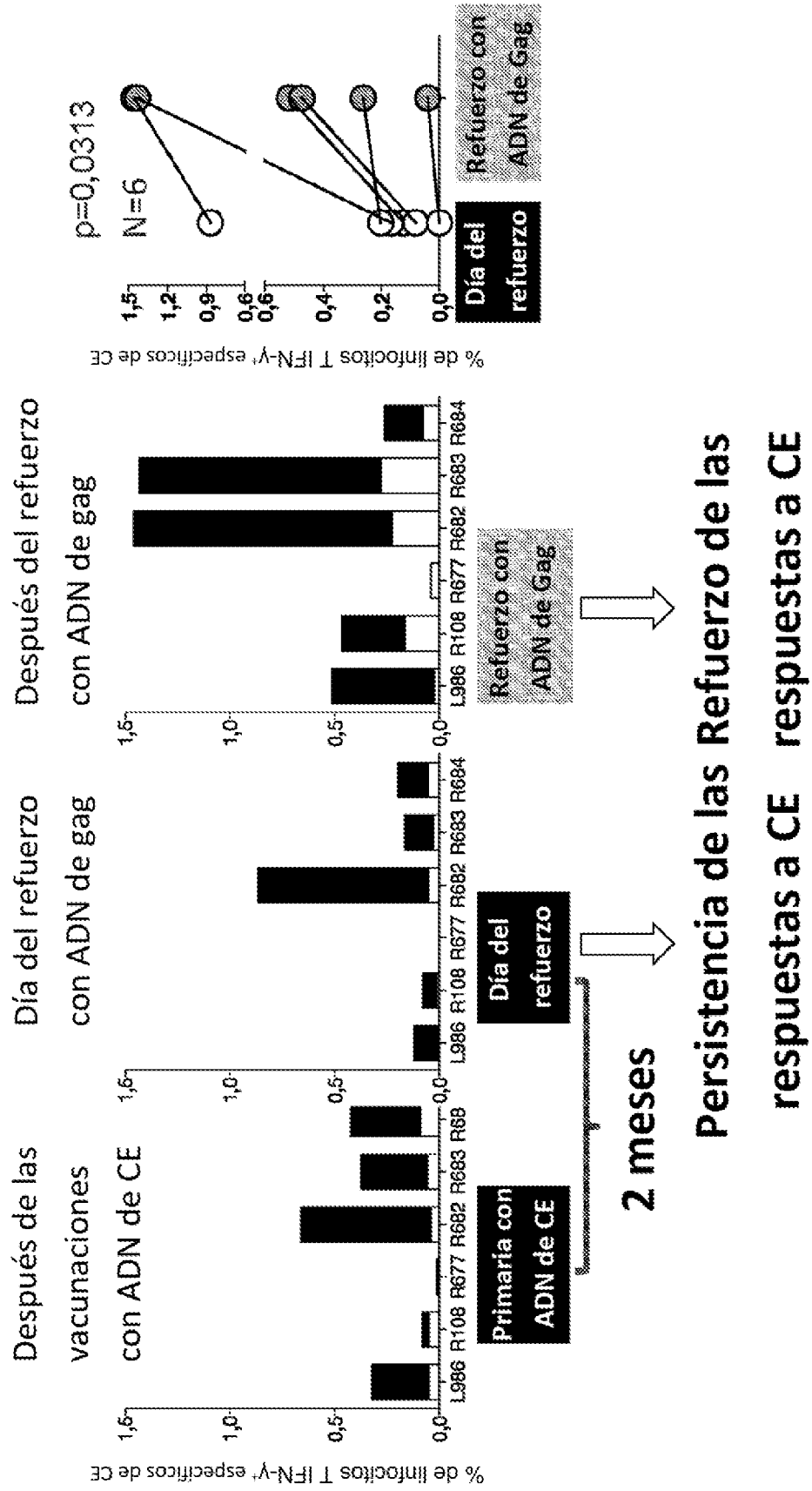


Figura 3

Figura 4



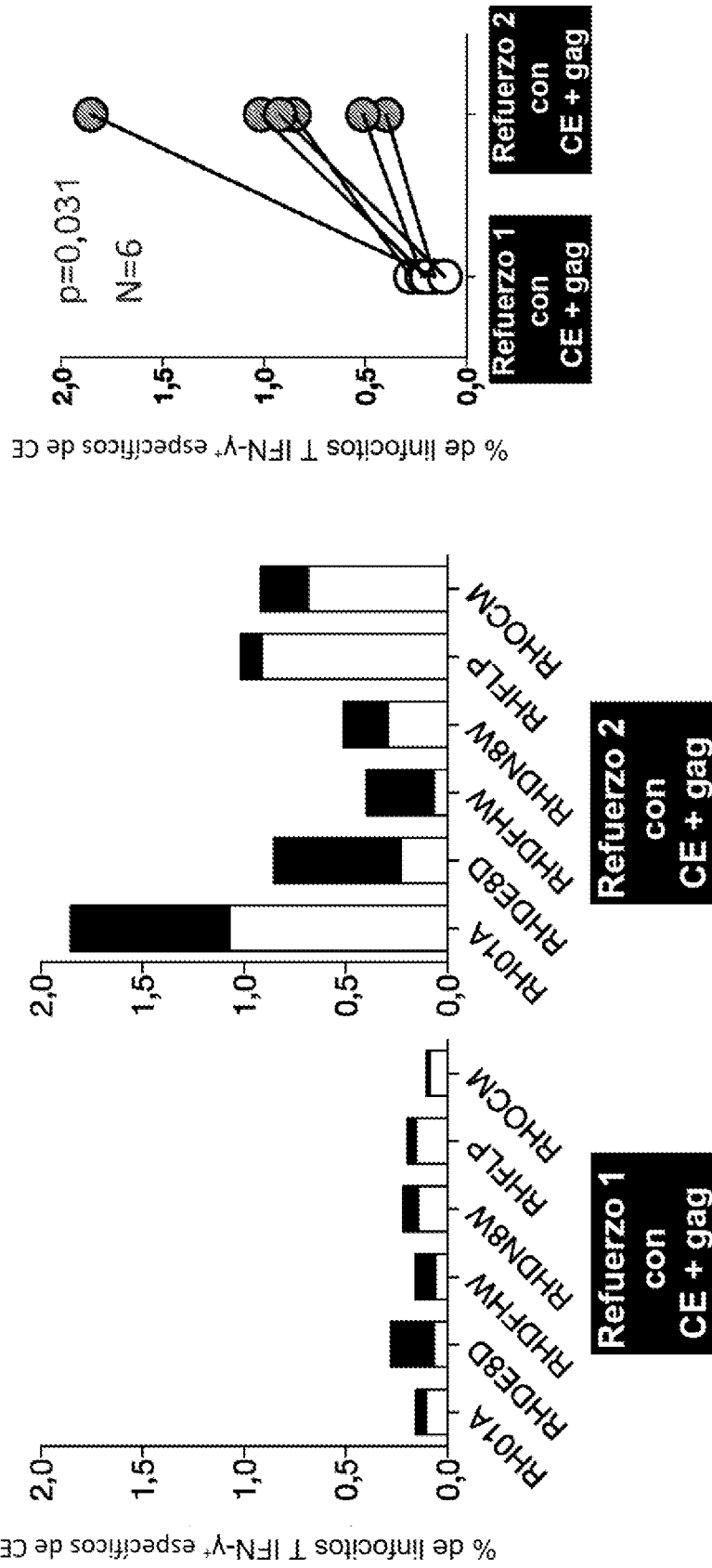


Figura 5

| Régimen de refuerzo con ADN de macacos primovacunados con CE | Animal | Respuesta a CE individuales | | | | | | | CE positivo/ animal | |
|--|--------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------|-----------|
| | | CE1 | CE2 | CE3 | CE4 | CE5 | CE6 | CE7 | n.º | Intervalo |
| Ninguno (N=14) | T129 | | | + | | | | | 1 | |
| | T136 | | | + | | + | + | | 3 | |
| | T137 | | | | | + | + | | 2 | |
| | T143 | | | | | + | | | 2 | |
| | T144 | | | + | | + | + | | 4 | |
| | T148 | + | | | | | | | 1 | |
| | T150 | | | | | + | | + | 2 | |
| | T152 | | | + | | + | | | 3 | 1 a 4 |
| | L986* | | | | | + | + | + | 2 | |
| | R108* | | | | | + | + | + | 2 | |
| | R677* | | | + | | | | | 1 | |
| | R682* | | | + | | + | + | | 3 | |
| | R683* | | | + | | + | | | 2 | |
| | R684* | | | | | + | | | 2 | |
| gag (N=6) | L965* | | | | | + | + | | 2 | |
| | R108* | | | | | + | + | | 2 | |
| | R677* | | | + | | | | | 1 | 1 a 3 |
| | R682* | | | + | | + | | | 3 | |
| | R683* | | | + | | + | | | 2 | |
| | R684* | | | + | | + | | | 3 | |
| Administración conjunta de CE y gag (N=6) | 01A | + | + | + | | + | + | + | 6 | |
| | DE8D | | | + | | + | | | 2 | |
| | DFHW | + | + | + | | + | | | 4 | |
| | DN8W | + | | + | | + | + | | 4 | 2 a 6 |
| | FLP | | + | + | + | + | | | 4 | |
| | OCM | | + | + | | + | + | + | 5 | |

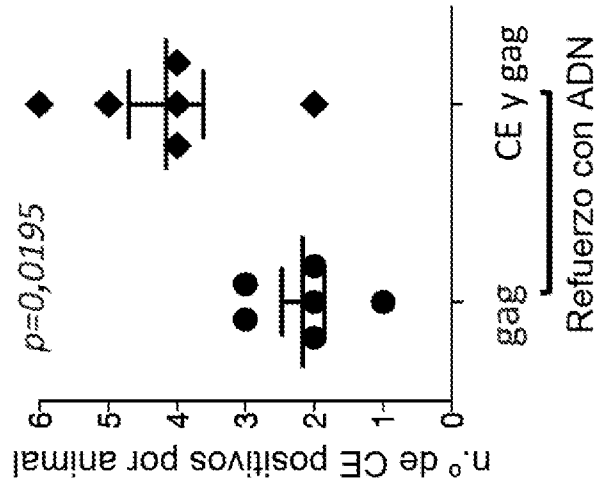


Figura 6

Figura 7

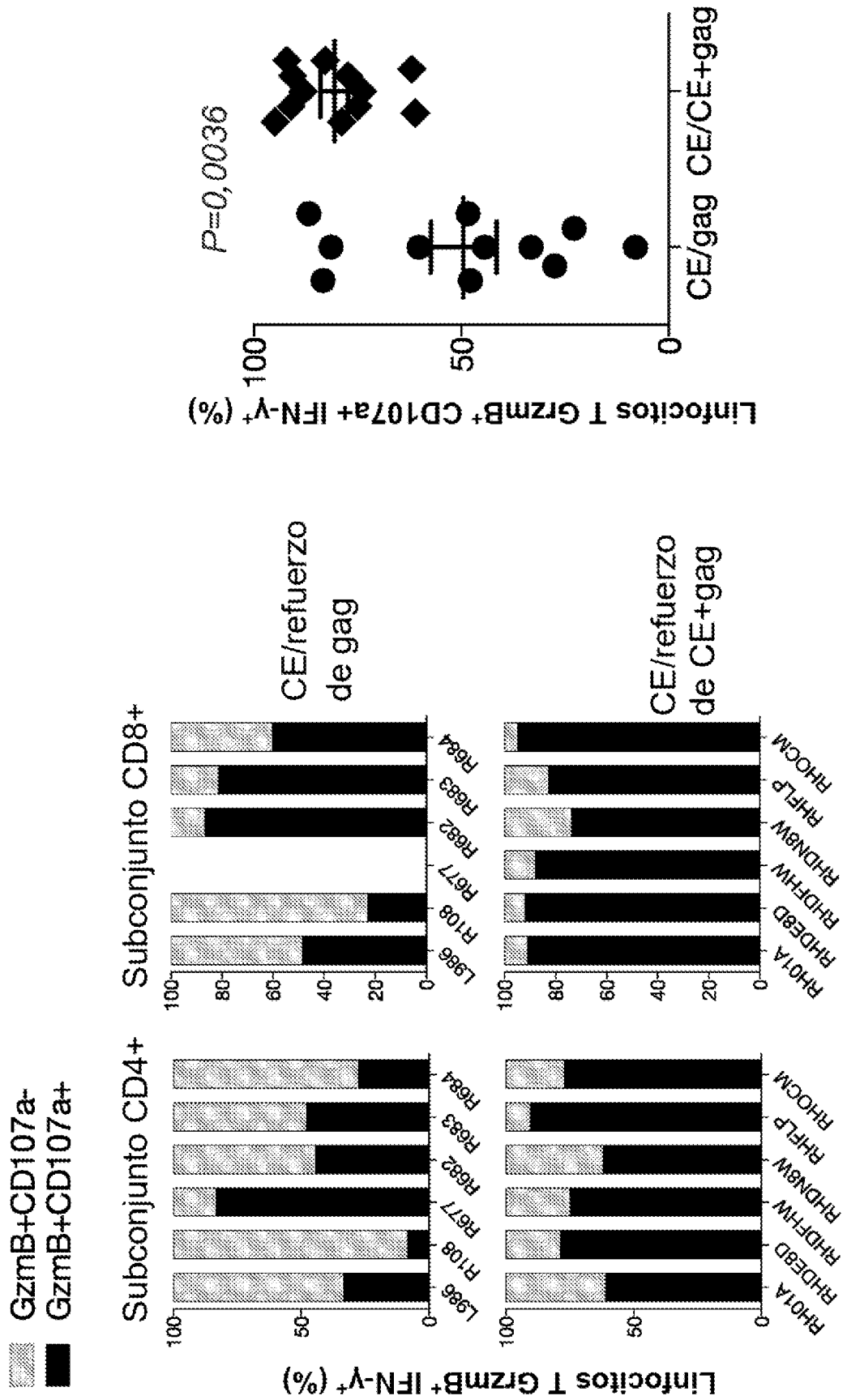


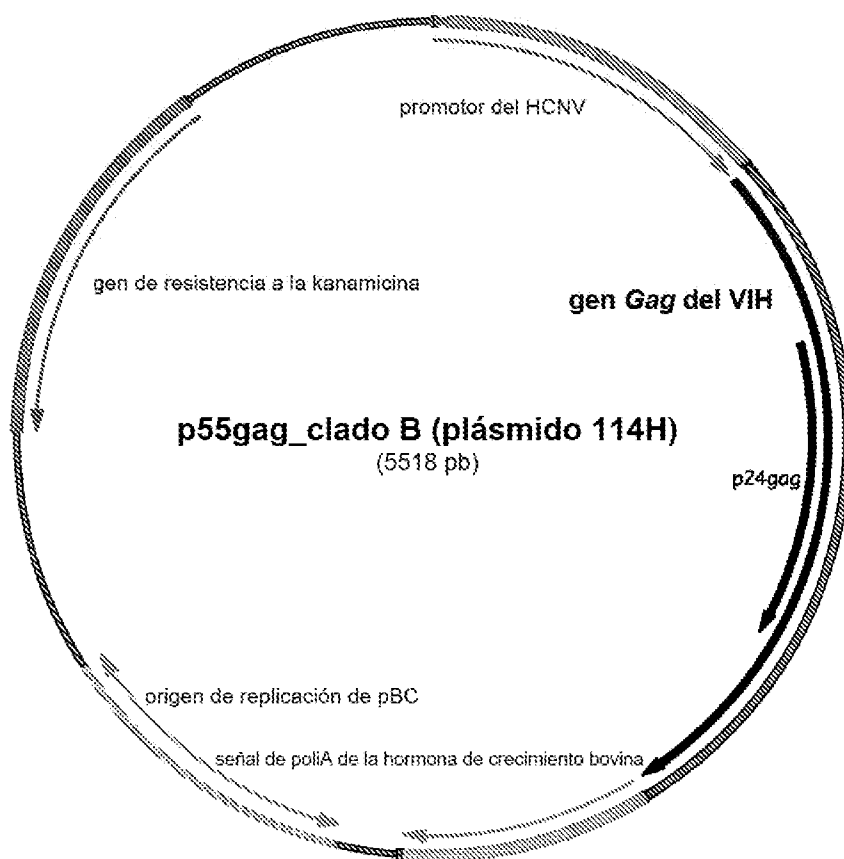
Figura 8A

Esquema del ADN plasmídico p24CE1/2 (código del plásmido 306H)



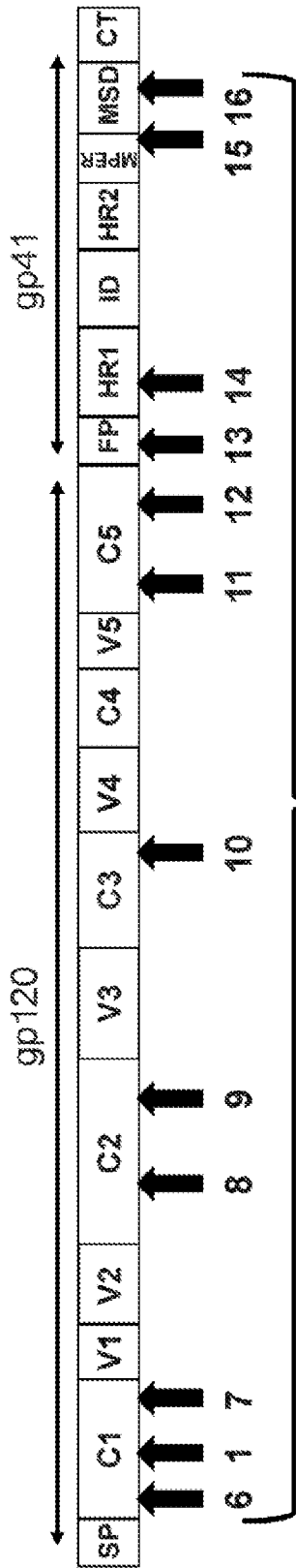
Figura 8B

Esquema del ADN plasmídico p55^{gag} (código del plásmido 114H)



S

Ubicación de las 12 regiones conservadas en Env del VIH



Ubicación de CE individuales en regiones de env:

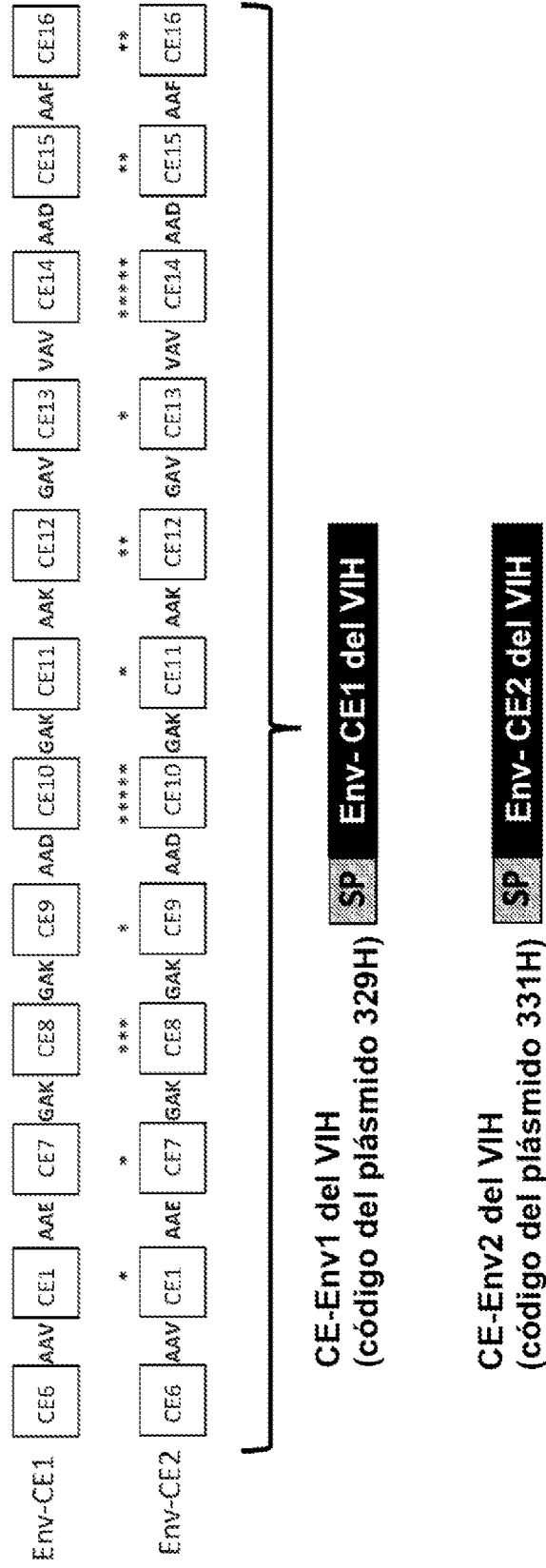
| | |
|-----------------|--------------------------------------|
| CE6, CE1 y CE7: | C1 |
| CE8 y CE9: | C2 |
| CE10: | C3 |
| CE11 y CE12: | C5 |
| CE13: | Péptido de fusión |
| CE14: | Región heptada aminoterminal de gp41 |
| CE15: | MPER/MSD |
| CE16: | MSD |

Legenda:

- C1-C5: regiones conservadas
- V1-V5: regiones variables
- SP: péptido señal
- FP: péptido de fusión
- HR1 y HR2: regiones heptadas amino y carboxiterminal
- ID: péptido inmunodominante en el bucle que separa HR1 Y HR2
- MPER: región externa próxima a la membrana de gp41
- MSD: dominio que atraviesa la membrana
- CT: cola citoplásmica de gp41

Figura 9

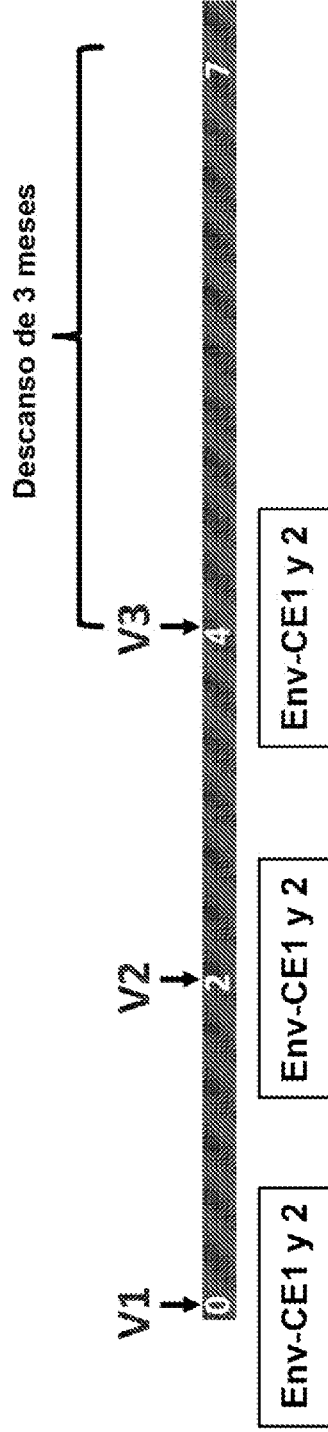
Las proteínas Env-CE1 y Env-CE2 del VIH consisten cada una en 12 regiones conservadas dispuestas colinealmente y conectadas mediante enlaces de 3 aa



Env-CE1 y Env-CE2 incluyen 220 aa procedentes del VIH, altamente relacionados y que difieren en 24 aa. Cada una consiste en un total de 284 aa (incluidos los enlaces de 3 aa y un péptido señal de 29 aa)

Figura 10

Vacunación de macacos sin tratamiento previo (N=4) con ADN de Env-CE del VIH



Vacuna: mezcla de ADN de Env 1 y 2 del VIH potenciada con ADN de IL-2 de macaco y administrada por vía intramuscular seguido de electroporación *in vivo*



Análisis de las respuestas inmunitarias específicas de CE in sangre a las 2 semanas después de V2 y V3 y después de un periodo de descanso de 3 meses

Figura 11

La vacuna de Env-CE induce respuestas de linfocitos T específicos de CE sólidas y duraderas en macacos vacunados con ADN

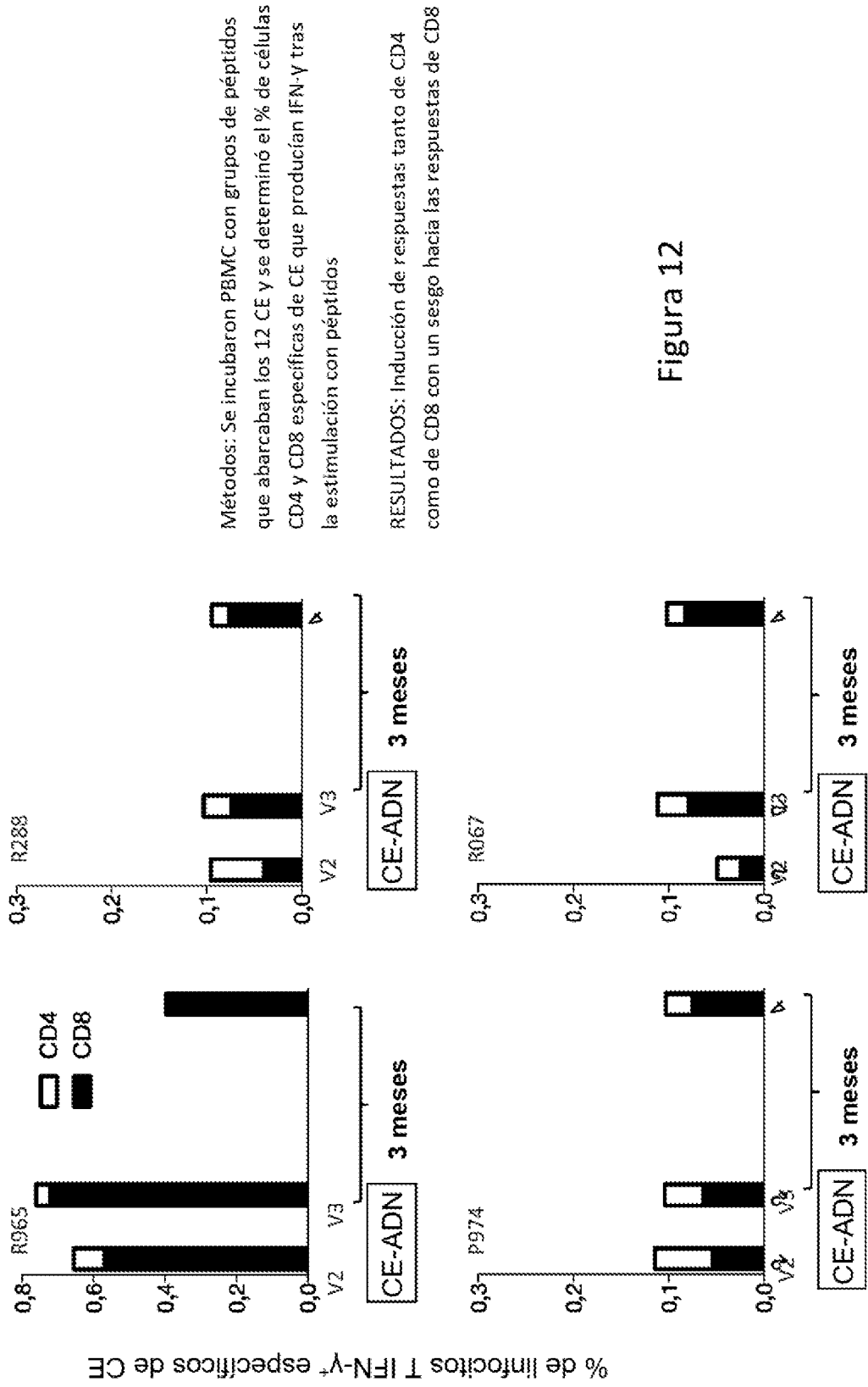
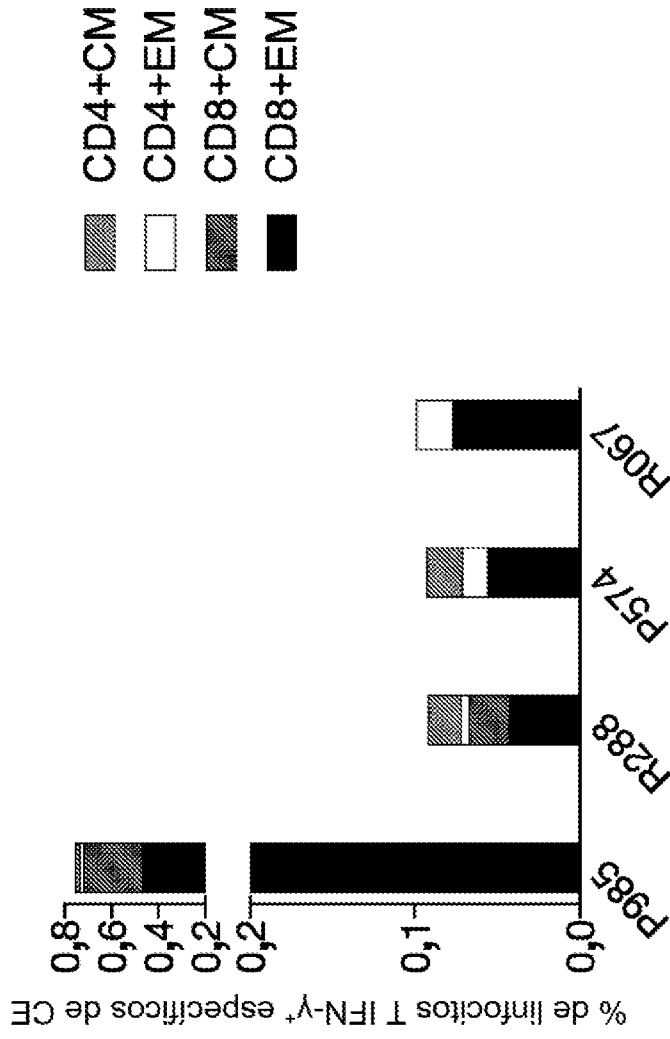


Figura 12

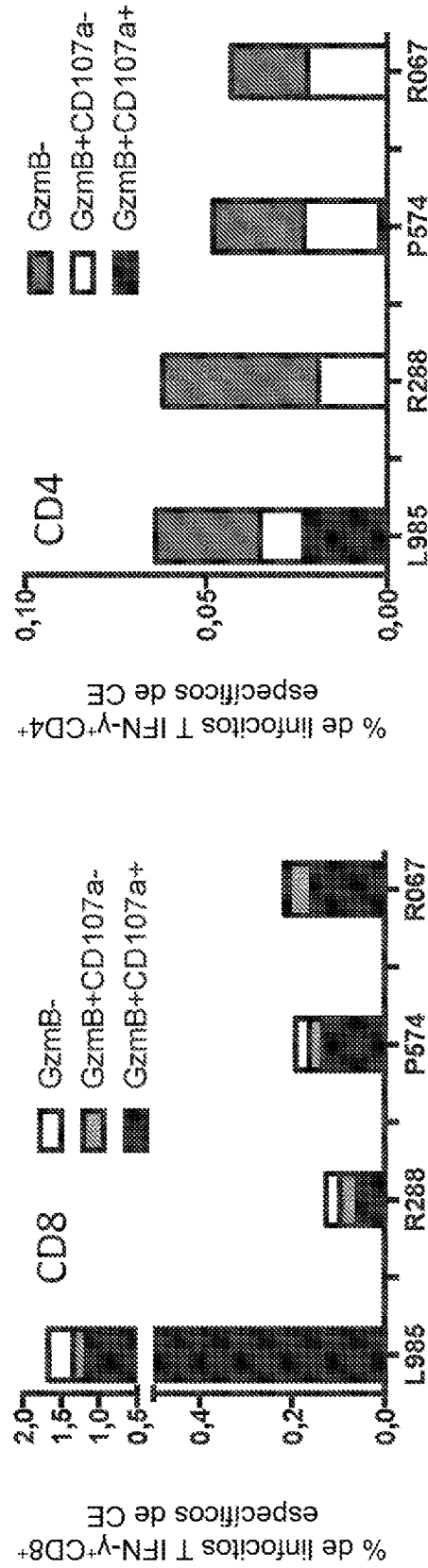
La vacuna de ADN de Env-CE induce respuestas de linfocitos T de memoria



Métodos: Se incubaron PBMC con grupos de péptidos que abarcaban los 12 CE y se determinó el % de linfocitos T de memoria central (CM; CD28⁺CD95⁺) y de memoria efectora (EM; CD28⁻CD95⁺) CD4 y CD8 específicos de CE que producían IFN- γ y tras la estimulación con péptidos

Figura 13

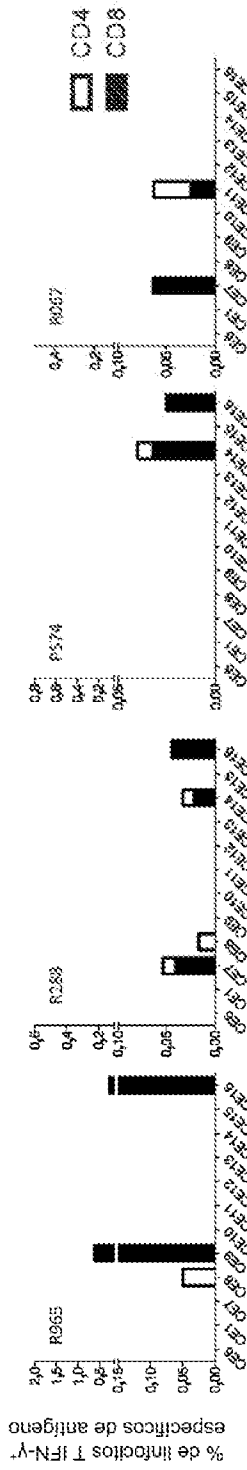
La vacunación con ADN de Env-CE induce respuestas específicas de CE con una fracción significativa de linfocitos T CD8⁺ (Granzima B⁺ y CD107a⁺)



Métodos: Se incubaron PBMC con grupos de péptidos que abarcaban los 12 CE. Se determinó el % de linfocitos T CD4 y CD8 específicos de CE que producían IFN- γ y que portaban granzima B⁺ y expresaban CD107⁺ tras la estimulación con péptidos

Figura 14

El mapeo de las respuestas específicas de CE muestra el reconocimiento de 6 de los 12 CE



| Vacuna | Macaos | | Respuestas inmunitarias celulares a CE individuales | | | | | | | | | | | | CE positivos/animal | | Tasa de respuesta | | |
|---------------------------|---------------|---|---|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|---------------------|-----------|-------------------|-------------------|---|
| | ID del animal | N | CE6 | CE1 | CE7 | CE8 | CE9 | CE10 | CE11 | CE12 | CE13 | CE14 | CE15 | CE16 | n.º de CE | intervalo | | | |
| ADN De CE de Env (EP3wk2) | P985 | 4 | | | | + | | | | | | | | | + | 3 | 2 a 4 CE | 100 % (4 de 4) | |
| | R288 | | | + | | | | | | | | | | | + | 4 | | | |
| | P574 | | | | | | | | | | | | | | | + | | | 2 |
| | R057 | | | + | | | | | | | | | | | | + | | | 2 |

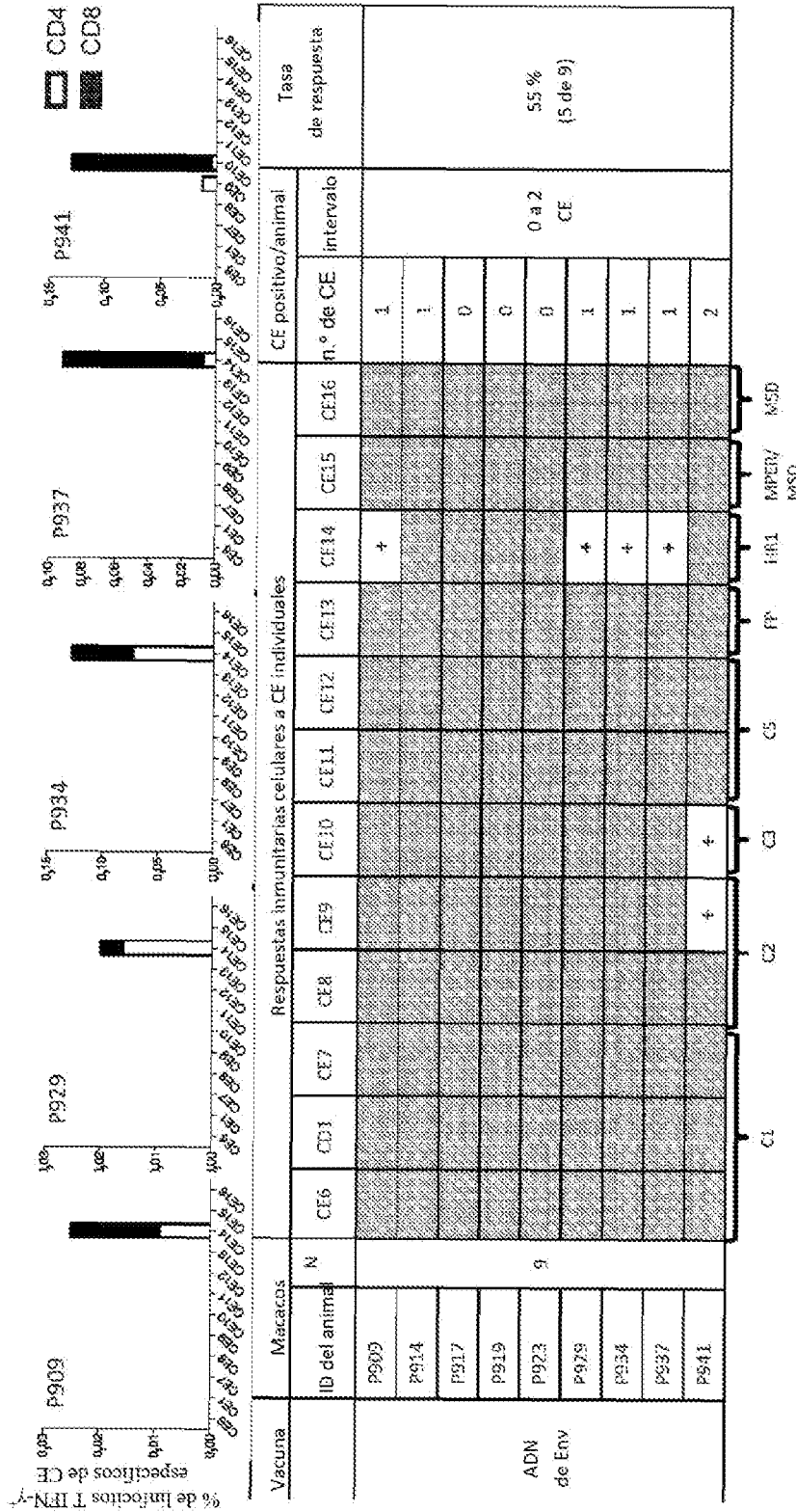
Leyenda:
 C1-C5: regiones conservadas
 FP: péptido de fusión
 MPER: región externa próxima a la membrana de gp41
 HR1: regiones heptadas aminoterminales de gp41
 MSD: dominio que atraviesa la membrana

Métodos: Se incubaron PBMC con grupos de péptidos individuales que abarcaban los 12 CE y se determinó el % de células CD4 y CD8 específicas de CE que producían IFN-γ tras la estimulación con péptidos

Figura 15

Resultados: Reconocimiento de 2 a 4 CE por animal. Seis de los CE son inmunógenos en los 4 animales analizados (CE6, CE1, CE10, CE12, CE13 y CE15 no desarrollaron respuestas celulares)

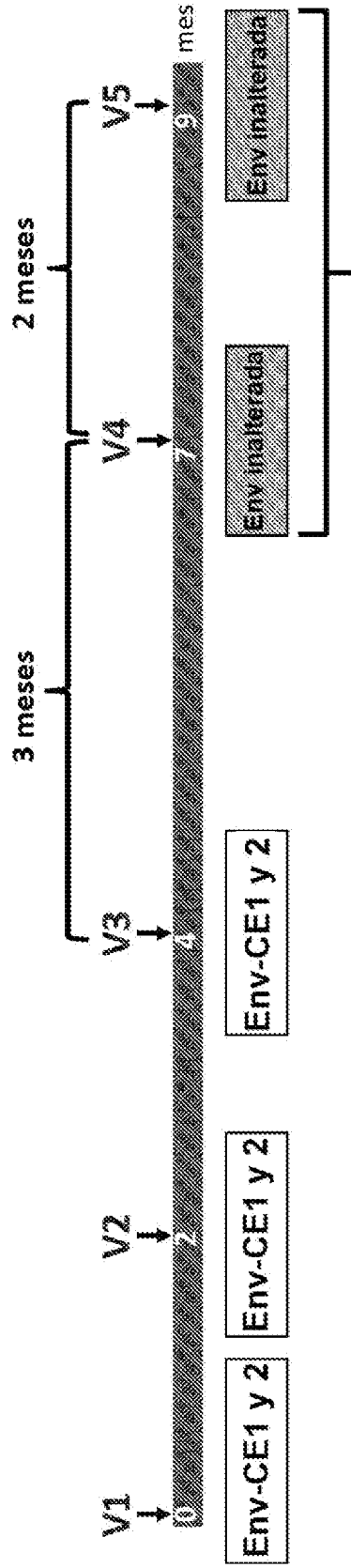
Por el contrario, la vacunación de 9 macacos con ADN que expresa Env completa no induce respuestas específicas de CE o son pobres



Legenda:
 C1-C5: regiones conservadas
 FP: péptido de fusión
 HR1: regiones heptadas aminoterminales de gp41
 MPER: región externa próxima a la membrana de gp41
 MSD: dominio que atraviesa la membrana

Figura 16

Vacunación primaria y de refuerzo con Env-CE del VIH como primovacuna y ADN de Env como refuerzo



El refuerzo era una mezcla de ADN de env compuesto de ADN de Env de Bal y 6101 del clado B y 1086 del clado C que reunía las 24 secuencias de los CE presentes en las proteínas Enc CE1 y Env CE2 del VIH. La molécula Env inalterada producida (gp145) carece del bucle inmunodominante en la parte extracelular de gp41.

Figura 17

Las respuestas provocadas con Env-CE se refuerzan tras la vacunación con Env inalterada

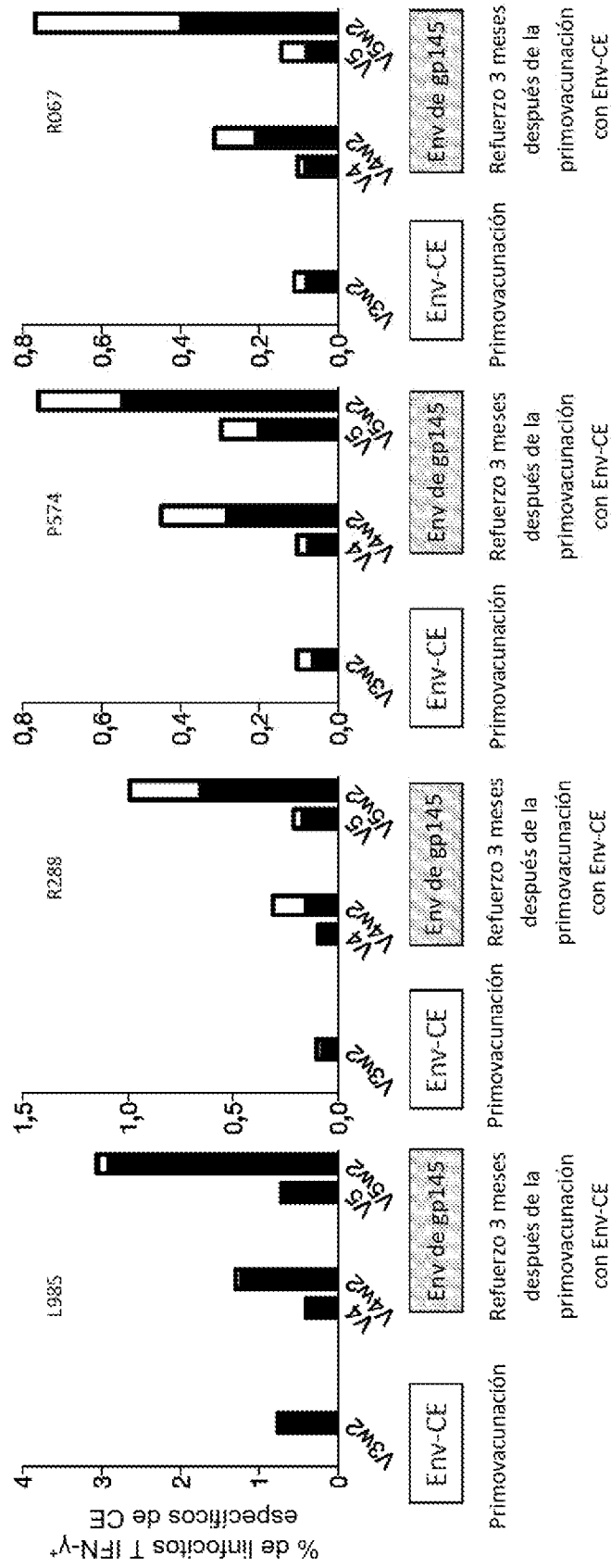


Figura 18

Comparación de las respuestas de CE individuales antes y después del refuerzo con plásmidos de ADNp que expresan Env inalterada

| N.º de CE | Respuestas inmunitarias celulares a CE individuales | | | | | | | | | | | | | | | CE positivo/ animal |
|-----------|---|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|-----------|---|------------------------|
| | CE1 | CE6 | CE7 | CE8 | CE9 | CE10 | CE11 | CE12 | CE13 | CE14 | CE15 | CE16 | CE16 | N.º de CE | | |
| AA/CE | 14 | 11 | 21 | 15 | 23 | 21 | 12 | 12 | 14 | 43 | 20 | 14 | | | | |
| L985 | cebado | | | + | + | | | | | | | | | + | 3 | |
| | refuerzo 1 | | | + | + | | | | | + | | | | + | 4 | |
| | refuerzo 2 | | | + | + | | | | | + | | | | + | 4 | |
| R288 | cebado | | | + | + | | | | | + | | | | + | 4 | |
| | refuerzo 1 | | | + | + | | | | | + | | | | + | 4 | |
| | refuerzo 2 | | | + | + | | | | | + | | | | + | 4 | |
| P574 | cebado | | | | | | | | | + | | | | + | 2 | |
| | refuerzo 1 | | | | | | + | | | + | | | | + | 3 | |
| | refuerzo 2 | | | + | | | + | | + | + | | | | + | 5 | |
| R067 | cebado | | | + | | | + | | | | | | | | 2 | |
| | refuerzo 1 | | | + | | | + | | | + | | | | + | 3 | |
| | refuerzo 2 | | | + | + | | + | | | + | | | | + | 4 | |

Se detectaron pocas respuestas nuevas después del refuerzo (*), que podrían ser respuestas de recuerdo presentes en niveles inferiores al umbral después de la vacunación con ADN o respuestas de *novo* inducidas por el refuerzo con la vacuna de env inalterada

Figura 19

La vacuna de ADN de Env-CE induce anticuerpos que pueden reconocer Env de gp120 mediante ELISA (VIH-1 IIB)

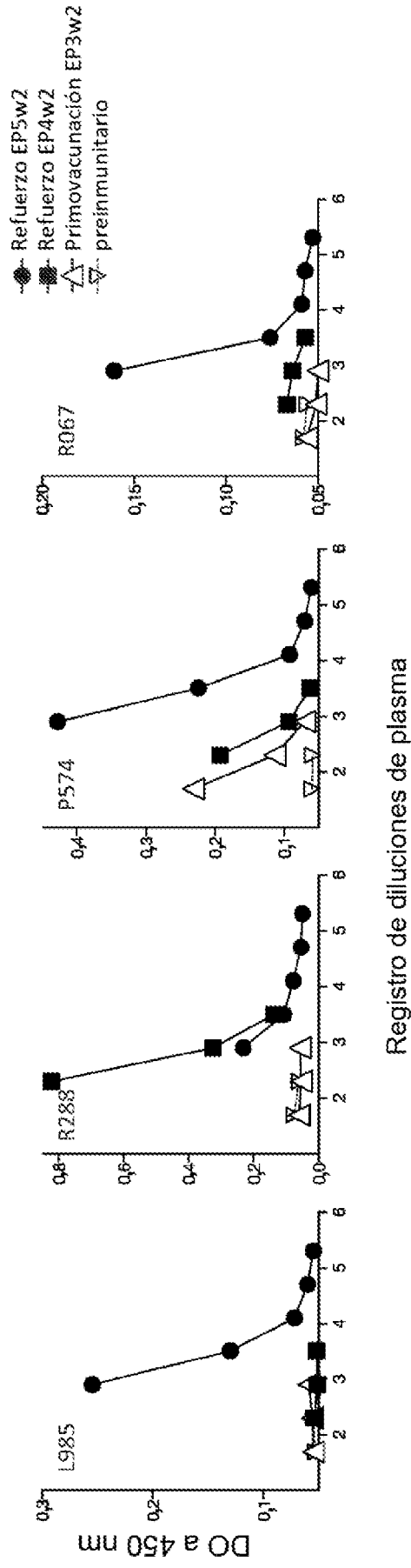
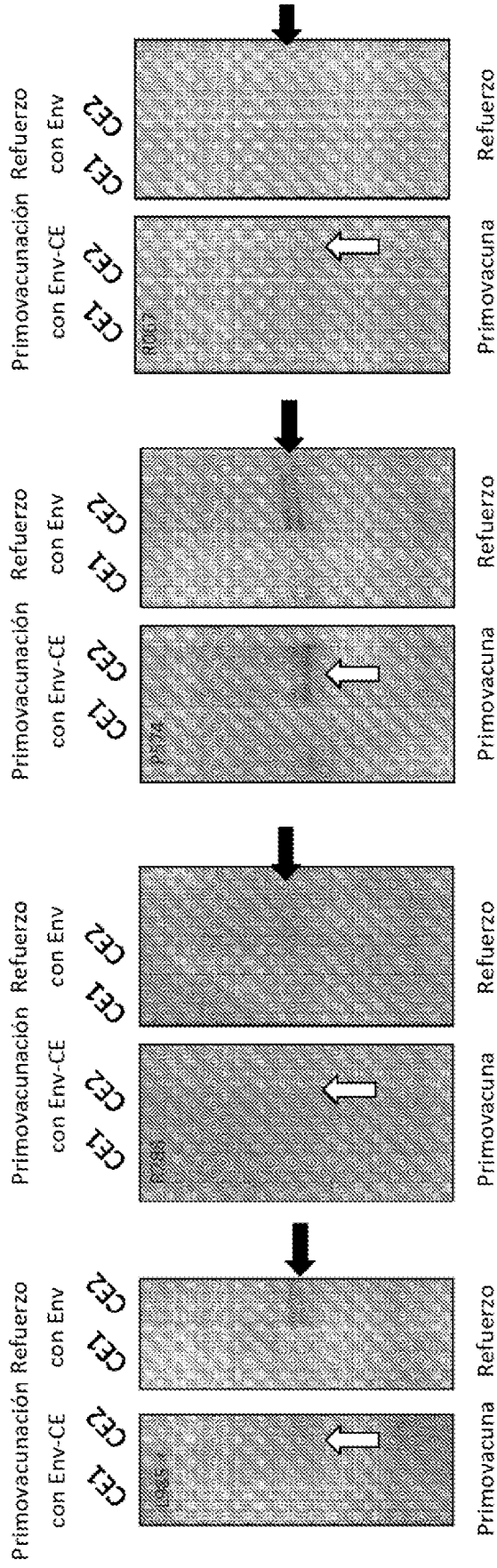


Figura 20

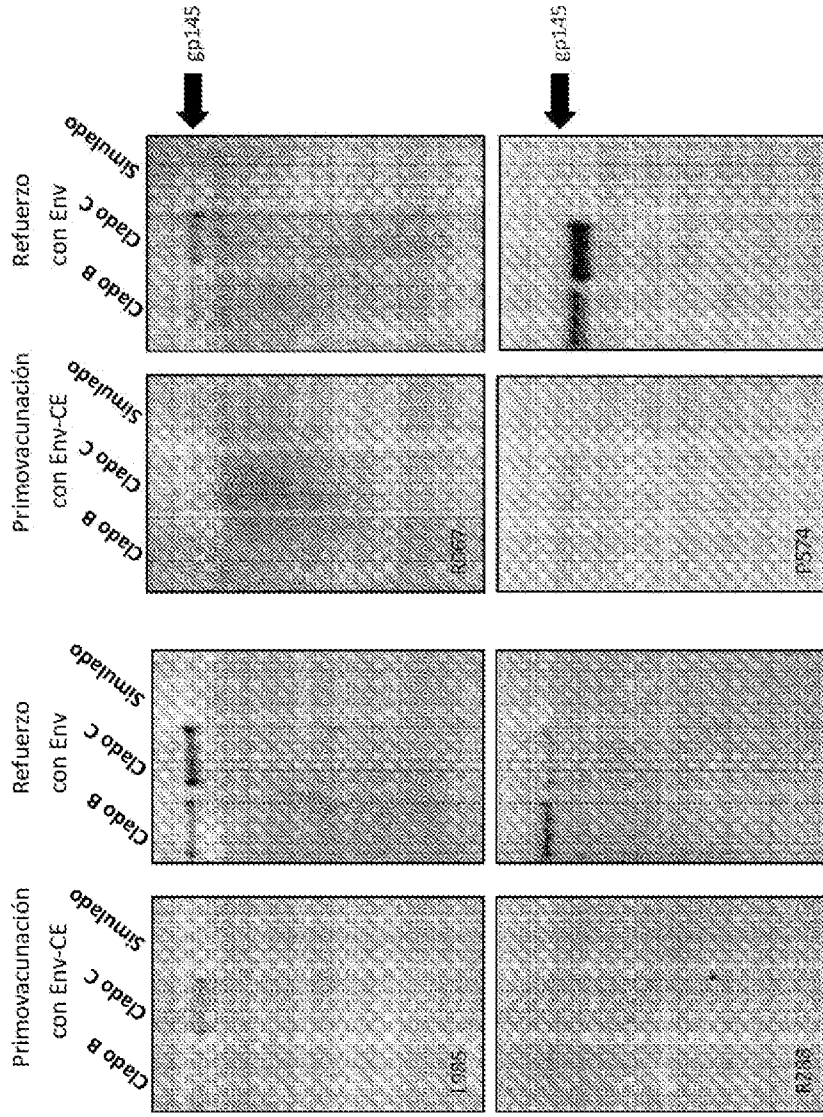
Análisis de las respuestas inmunitarias tumorales mediante inmunotransferencia de Western



Métodos: Las proteínas de las células transfectadas con ADN de env-EC1 del VIH o ADN de env-EC2 del VIH se separaron en geles desnaturizantes y se transfirieron a membranas. Se incubaron tiras individuales de membranas con plasma (dilución 1:100) de los macacos vacunados y se visualizaron utilizando la metodología de transferencia Western convencional.

Figura 21

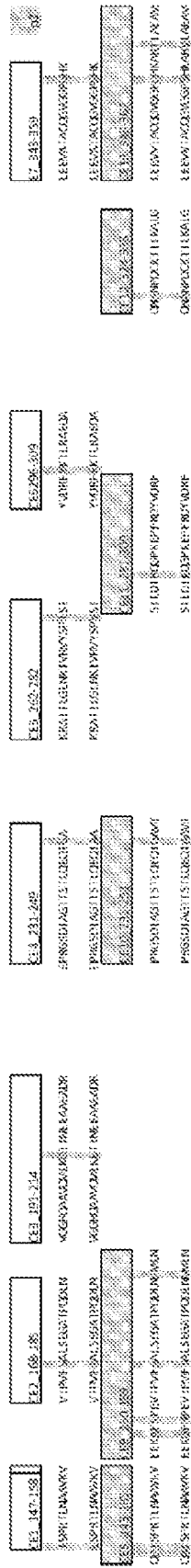
Los anticuerpos inducidos por la vacuna de Env-CE del VIH reconocen proteínas Env del VIH inalteradas del caldo B y del clado C del VIH



Métodos: La proteína gp145 de células transfectadas se separó en geles de acrilamida desnaturalizantes y se transfirió a membranas. A continuación, las membranas se incubaron con plasma de macacos primovacunados con ADN de env-CE y se reforzaron con ADN de env inalterada.

Figura 22

CE de Gag de p24 del VIH iniciales y alternativos



Los CE iniciales se indican en recuadros claros con las posiciones de los aminoácidos dentro de la proteína Gag indicadas (utilizando HXB2 como referencia)

Los CE alternativos se indican en recuadros sombreados

Los sitios de alternancia están sombreados

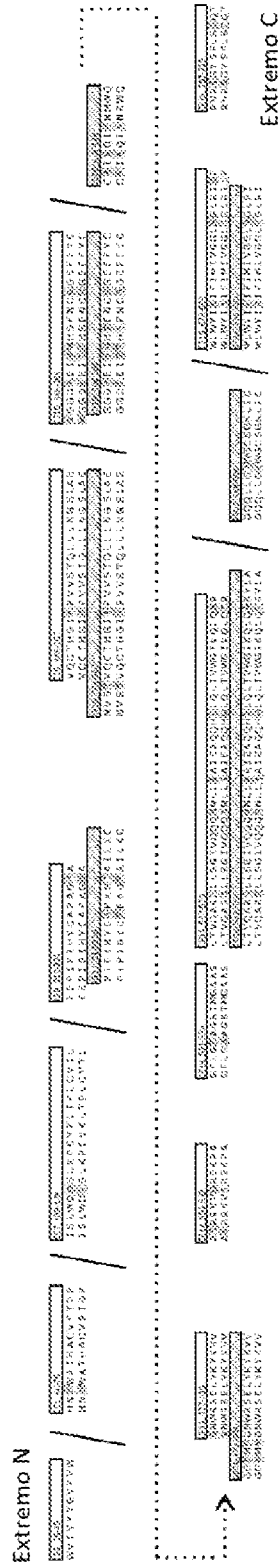
Todos los restos de AA están dentro de la proteína p24 excepto los últimos 4 AA, que son de la proteína p2

Notas:

- CE8 puede sustituir a CE1: Capta un epítipo adicional
- CE9 puede sustituir a CE2: Captura epítipos favorables en los extremos N y C
- CE10 puede sustituir a CE4: Posible aumento de la inmunogenia por la extensión del extremo C
- CE11 puede incluirse debido a su fuerte conservación y a los lugares estructuralmente vulnerables.
- CE12 capta los lugares estructuralmente vulnerables
- CE13 podría sustituir a CE7: capta un epítipo adicional y se extiende a la proteína p2

Figura 23

CE de Env del VIH iniciales y alternativos



Los CE se enumeran desde el extremo aminoterminal al carboxiterminal de la proteína de Env gp160. Los sombreados indican que las distancias entre los CE están alteradas. Los CE iniciales están indicados en recuadros claros con las posiciones de los aa dentro de la proteína Env indicadas (utilizando HXB2 como referencia)

Los CE alternativos se indican en recuadros sombreados
Los sitios de alternancia están sombreados

- CE17 puede sustituir a CE8
- CE18 puede sustituir a CE9: Capta un epítipo adicional en el extremo N
- CE19 puede sustituir a CE10: Elimina el sitio de alternancia en el extremo N y añade un sitio de alternancia interno
- CE20 capta un epítipo favorable y un sitio estructuralmente vulnerable
- CE21 puede sustituir a CE11: capta un epítipo adicional y un sitio estructuralmente vulnerable
- CE22 puede sustituir a CE14: Capta un epítipo adicional
- CE23 capta epítipos adicionales
- CE24 puede sustituir a CE15: elimina un sitio de alternancia, pero conserva epítipos

Figura 24

Env-CE1_V1V2 BaL-Figura 25

1 ATG CGG GTG ACG GAG ATC CGG AAG TGG TAT CAG CAC TGG TGG CGG TGG GGC ATC ATG CTC CTT GGG ATA
18 M R V T E I R K S Y Q H W W R W G I M L L G I
70 CTG ATG ATC TCC AAC GGC GAG AAG CTG TGC GAT GGG GAG TGG AAC GAG GGC ACC AAG
19 W V T V Y G V P V W
244 L M I C N A E E K L W V T V Y G V P V W K E A Y T
148 ACC CTG TTC TGC GCG ACC GAC CAC ACC GAG GTG CAC AAG GTC TGG GTC AAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG
507 T I F C A S G R K A Y D T E V H N V W A T H A C V P
326 AAG GAG AAC ACC CAC GAG GTC GAA CTG AAG AAC GTC ACC GAG AAC TTA AAC ATG TGG AAG AAC AAC ATG
72 T D P
788 T D P M P Q E V E L K N V T E N F N M W K N N N N
208 GTS GAG GAG ATG CAC GAG CAC ATC AAG TGG GAG TGG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG
190 V E Q M H E D I I S L W D Q S L K R P C V K L T P L C V T L
365 AAC TCC ACC GAC CTG CGC AAC GCC ACC AAG GGC AAC GAC ACC AAC ACC ACT AGT ACC TCG CGC CGC ATG
128 N C Y D L R N A T N G N O Y N I Y S S S R G M
484 GTG GGC GGC GAG ATG AAG AAC TGC AGC TTC AAC ATC ACG ACC AAC ATC CGC GGC AAG GTG CAG AAG
152 V G G G E M K N C S F N I T Y K I R G K V Q K
523 GAG TAC GGC CTG TTC TAC AAG CTG GAC ATD GGC CCT ATC GAG AAC AAC AAG AAC AAC GGC TAC CGG CTG
175 E Y A L F Y K L D I A P I D R N S H N R Y R L
582 ATC AGC TGC GGC GCT AAG TTA GGG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG
192 I S G G A K F E P I P I H Y C T P A G F A G A G A K V Q C T H G
882 GTC GAG
71 R P V S T Q L L N G S L A E I S G G D P E I V M H S F
228 I R P V V G T Q L L N G S L A E I S G G D P E I V M H S F
778 AAG TGC GGC
13 N C G E F F Y C I D N W R S E L Y K Y V V I A R R
360 N C G E F F Y C G A K D N W R S E L Y K Y V V A A K A R R
871 GGC
4 R V V Q R E R A G A V G F L G T A G S T M C A A S I L T
204 R V V Q R E R A G A V G F L G T A G S T M C A A S I L T
864 GTC GAG
2 V Q A R L L L S G I V G Q Q N N L L R A I E A Q Q H L L Q L T V
322 V Q A R L L L S G I V G Q Q N N L L R A I E A Q Q H L L Q L T V
160 GGC
35 W G I K O L Q A R I W L W Y I N I F I M I V G G I V G L R I
354 W G I K O L Q A R I W L W Y I N I F I M I V G G I V G L R I
1156 GCT GCA TTC GGC GTC CCG AAG TGG TAT CAG CAC TGG TGG CGG TGG GGC ATC ATG CTC CTT GGG ATA
19 R V R K G Y S P L S L G T
386 A A F R V R K G Y S P L S L G T