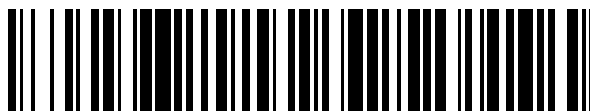


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 544**

51 Int. Cl.:

C07K 14/18 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2010** **E 10737715 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014** **EP 2456786**

54 Título: **Vectores de lentivirus pseudotipificados con una glucoproteína de envoltura de virus Sindbis**

30 Prioridad:

24.07.2009 US 228491 P

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

16.04.2014

73 Titular/es:

**IMMUNE DESIGN CORP (100.0%)
1616 Eastlake Ave. E., Suite 310
Seattle, WA 98102, US**

72 Inventor/es:

**ALLEN, JAMES M.;
VAN HOEVEN, NEAL S.;
LI, JIN ZHONG;
SLOAN, DEREK D. y
DUBENSKY, THOMAS W., JR.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 455 544 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

Vectores de lentivirus pseudotipificados con una glucoproteína de envoltura de virus Sindbis.

Campo técnico

- 5 Esta solicitud de patente se refiere en general a suministro de genes diana y más en particular al uso de un lentivirus pseudotipificado que comprende una envoltura que fija como objetivo células dendríticas y se puede usar así para vacunación con células dendríticas.

Antecedentes

- 10 Las células dendríticas (las CD) son células presentadoras de antígenos esenciales para la iniciación y control de respuestas inmunitarias. Las CD pueden capturar y procesar antígenos, migrar de la periferia a un órgano linfático y presentar los antígenos para que queden células T en un modo restringido del complejo principal de histocompatibilidad (CPH). Estas células proceden de médula ósea (MO) y muestran morfología dendrítica y alta movilidad. El descubrimiento de las CD como células presentadoras de antígeno especializadas (las CPA) ha impulsado intentos en estrategias de inmunización/vacunación a base de CD que implican cargar las CD in vitro con antígenos específicos (Banchereau y Palucka, A. K. 2.005. Nat. Rev. Immunol. 5: 296-306; Figdor, et al. 2.004. Nat. Med. 10: 475-480). Todos estos intentos, sin embargo, implican la trabajosa preparación de un tratamiento específico para el paciente que incluye la carga de las CD autólogas ex vivo con antígenos específicos, que se administran después al paciente.

- 20 Una estrategia alternativa es utilizar vectores a base de virus recombinantes como un mecanismo para suministrar directamente un gen que codifique un antígeno o antígenos designados a células huésped. En este caso, por inducción de una respuesta inmunitaria de adaptación deseada, el producto génico expresado proporciona beneficio terapéutico. Hay una serie de retos, sin embargo, para conseguir un sistema seguro y eficaz. Algunos de estos retos incluyen diseñar un vector que fije como objetivo una serie deseada de células huésped, proporcionar un sistema de suministro adecuado, expresar un antígeno deseado para provocar una respuesta inmunitaria eficaz y consecuentemente fabricar una composición farmacéutica con titulación suficientemente alta del virus de vector de virus recombinante a fin de que pueda ser utilizado ampliamente por una población de individuos humanos designada. Lo último es un reto particular en el desarrollo de sistemas a escala laboratorio en productos que se pueden producir por la industria farmacéutica.

- 30 En el laboratorio, muchos vectores lentivíricos se pseudotipifican con las proteínas de envoltura VSV-G. Esto se usa extensamente como sistema modelo ya que las proteínas de envoltura VSV pueden fijar como objetivo muchos tipos de células (una envoltura "pantrópica") y los sistemas de producción en general proporcionan un título alto.

- 35 Las glucoproteínas de envoltura de virus Sindbis y otros alfavirus desvelados en la presente memoria se incorporan a la bicapa lipídica de la membrana de la partícula vírica. Típicamente, la membrana vírica (envoltura) incluye múltiples copias de trómeros de dos heterodímeros de glucoproteínas, E1 y E2, que se producen de escisión de una sola proteína precursora. La proteína precursora comprende, desde su N- a C-terminal, las proteínas E3, E2, 6K y E1. La pequeña glucoproteína E3 sirve como secuencia señal para traslocación de la proteína E2 en la membrana y se escinde de E2 por furina o alguna otra serina proteinasa dependiente de Ca²⁺. La proteína 6K sirve como secuencia señal para traslocación de la proteína E1 en la membrana y se escinde después de la proteína precursora.

- 40 Las glucoproteínas E1 y E2 tienen cada una regiones de expansión de membrana; E2 tiene un dominio citoplasmático de aproximadamente 33 restos mientras la cola citoplasmática de E1 es muy corta (aproximadamente 2 restos). Tanto E1 como E2 tienen ácidos palmíticos unidos a o cerca de las regiones de expansión de membrana.

- 45 Se cree que los aislados de virus Sindbis descritos en la técnica infectan células vía una interacción con sulfato de heparán (SH). En la patente internacional WO 2008/011636 se describió un sistema de empaquetamiento lentivírico en que la proteína de fusión de envoltura E3/E2 (denominada SVGmu) contiene una serie de modificaciones, destinadas a reducir la unión de la proteína a SH pero mantener la unión a, e infección de, las CD, vía la molécula superficial CD-SIGN. En la patente internacional WO 2008/011636, el ADNc para SVG de cepa natural se obtuvo del laboratorio del laboratorio del Dr. J. H. Strauss en el Instituto de Tecnología de California y se clonó en el vector pcDNA3 (Invitrogen) por PCR para generar plásmido pSVG. Se insertó una secuencia tag de diez restos en proteína E2 entre los aminoácidos 71 y 74 por mutagénesis PCR para romper el sitio de unión de SH. Se introdujo una supresión adicional en la glucoproteína E3 de SVG para retirar los aminoácidos 61-64. Este SVG modificado se designó como SVGmu (SEC ID N°:11 de la patente internacional WO 2008/011636). El ADNc para SVGmu se clonó aguas abajo del activador de CMV en el vector pcDNA3 (designado como pSVGmu, SEC ID N°: 3 de la patente internacional WO 2008/011636).

Algunas realizaciones de la presente invención

- 55 Aunque las partículas víricas pseudotipificadas SVGmu podían transducir de manera selectiva células que expresan el antígeno CD-SIGN, varios aspectos del sistema lo hacen inadecuado para uso terapéutico. Por ejemplo, la

proteína de fusión E3/E2 muestra un epítipo antigénico de hemaglutinina de influenza, el genoma del virus se integra en el cromosoma huésped, que puede activar genes huésped perjudiciales y los presentes autores han encontrado que los títulos del virus fueron bajos comparados con el título de partículas pseudotipificadas con una envoltura de VSV-G. De manera significativa, las cepas de virus Sindbis con una mutación que evita el correcto tratamiento de E3 de la glucoproteína E2 (denominada "mutantes pE2"), tales como SVGmu, crecen de manera deficiente en estirpes celulares permitidas y son atenuadas seriamente en patogenicidad en ratón.

Una alineación de la proteína E3-E2 SVGmu usada en la patente internacional WO 2008/011636 para pseudotipificar un vector lentivírico contra tres variantes de proteína E ejemplares de la presente invención se muestra en la Figura 1. La numeración indicada en la Figura 1 es por referencia a la cepa HR de proteínas de envoltura de virus Sindbis. A menos que se indique de otro modo, la numeración usada en la presente memoria es por referencia a esta cepa de virus Sindbis. Los presentes autores han modificado la proteína SVGmu para proporcionar un sistema de producción lentivírica mejorado. Las partículas víricas de la invención se producen en un título significativamente mayor que aquéllos usando SVGmu y también estimulan una respuesta inmunitaria más fuerte. Además, las partículas lentivíricas pseudotipificadas presentan título mejorado e infectividad mejorada al tiempo que se mantiene la selectividad para las CD.

En una realización, la invención proporciona una partícula de vector lentivírico que comprende: (a) una envoltura que comprende (i) una glucoproteína E2 de virus Sindbis de la SEC ID N°: 1 en que 160X está ausente o es un aminoácido distinto de ácido glutámico o una variante de la SEC ID N°: 1 del mismo con al menos 80% de identidad para la SEC ID N°: 1 y en que 160X está ausente o es un aminoácido distinto de ácido glutámico, capaz de infectar células dendríticas; en la que E2 no es parte de una proteína de fusión con virus Sindbis E3 y (b) un genoma de vector lentivírico que comprende una o más secuencias de interés.

La variante puede ser capaz de unirse a DC-SIGN. Preferiblemente, también presenta unión reducida a sulfato de heparán comparado con una proteína de referencia de cepa HR. La proteína E2 de la cepa HR se muestra como SEC ID N°: 18.

Preferiblemente, 160X es uno de los aminoácidos pequeños o alifáticos, incluyendo glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina. En un aspecto, 160X está ausente o es glicina, valina, leucina o isoleucina. En una realización, X es glicina.

Una variante de la SEC ID N°: 1 se define como que comprende una secuencia con al menos 80% de identidad de secuencia o al menos 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95% o 98% de identidad de secuencia para la SEC ID N°: 1 en que 160X es retenido y como se definió anteriormente. La variante puede tener una o más de las lisinas y argininas en los restos 50 a 180 de expansión de la región suprimidas o sustituidas independientemente con un aminoácido no básico. En una realización, el aminoácido no básico es ácido glutámico o ácido aspártico.

En un aspecto, el resto X se selecciona de una supresión, glicina, valina, leucina o isoleucina y una o más de las lisinas y argininas en los restos 50 a 180 de expansión de la región son suprimidas o sustituidas independientemente con un aminoácido no básico.

En otro aspecto, X se selecciona de una supresión, glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina y una o más de las lisinas y argininas en los restos 50 a 180 de expansión de la región, incluyendo preferiblemente al menos la posición 159, son suprimidas o sustituidas independientemente con ácido glutámico o ácido aspártico.

Los aminoácidos cargados positivamente, candidatos, que pueden ser sustituidos o suprimidos, incluyen lisinas en los restos 63, 70, 76, 84, 97, 104, 129, 131, 133, 139, 148, 149 y 159 y arginina en los restos 65, 92, 128, 137, 157, 170 y 172 (la numeración se refiere a la SEC ID N°: 1). Cuando se sustituyen, la sustitución se puede elegir independientemente de ácido glutámico o ácido aspártico.

En realizaciones particulares, se suprime o sustituye uno o más de los restos de lisina 70, 76 y 159. Cuando se sustituyen, las sustituciones se pueden elegir independientemente de ácido glutámico o ácido aspártico.

Como el virus Sindbis presenta un genoma de ARN, las variaciones - incluyendo sustituciones, inserciones o supresiones - además de las mencionadas anteriormente se pueden realizar para partes de la secuencia E2 de la SEC ID N°: 1, dentro del alcance de la homología en porcentaje a la SEC ID N°: 1 definida anteriormente. Por ejemplo, existen variantes de la SEC ID N°: 1 en que la posición 3 es T o V, 23 es V, 209 es R, 264 es G y 393 es H. Se puede realizar uno o más de estos cambios u otras variaciones para la SEC ID N°: 1, siempre que la variante mantenga la capacidad para infectar las CD.

En una realización, las variantes no contienen inserciones en la región entre los restos 70 y 76 de la SEC ID N°: 1. En esta realización, la secuencia de los restos 71-75 de la SEC ID N°: 1 puede ser igual o puede comprender una o dos sustituciones que no afectan a la capacidad de la variante para infectar las CD.

En algunos casos, primero se expresa proteína E2 como una poliproteína en fusión con al menos E3 o en fusión con una secuencia líder. En algunas realizaciones, E2 se expresa como parte de poliproteína E3-E2-6K-E1. El virus Sindbis expresa de manera natural E2 como parte de una poliproteína y las regiones de unión para E3/E2, E2/6K y

6K/E1 presentan secuencias reconocidas y escindidas por endopeptidasas. La secuencia de poliproteínas E3/E2 se presenta como SEC ID N°: 20. Normalmente, la unión E3/E2 se escinde por furina o una serina endopeptidasa tipo furina entre los restos 65 y 66 de la poliproteína E3/E2. La furina presenta especificidad para restos arginina apareados que están separados por dos aminoácidos. Para mantener Escisión E3/E2 por furina, los restos 62-66 (RSKRS; SEC ID N°: 26) deberían mantener los dos restos arginina con separación de dos aminoácidos y el resto serina.

En una realización de la invención, la poliproteína comprende una secuencia E3 que corresponde a los restos 1-65 de la SEC ID N°: 20 o una variante de la misma con al menos 80% de identidad de secuencia o al menos 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95% o 98% de identidad de secuencia para los restos 1-65 de la SEC ID N°: 20, en la que los restos 62-65 son RSKR (SEC ID N°: 27) y la variante es capaz de incorporarse a una envoltura vírica pseudotipificada. Preferiblemente, la parte E2 de la poliproteína es cualquiera de las realizaciones como se definió en la presente memoria anteriormente.

Alternativamente, se puede usar una secuencia de escisión diferente en vez de la secuencia de escisión de furina E3/E2 o cualquiera de las otras secuencias de escisión. Los sitios de reconocimiento y escisión se pueden incorporar para endopeptidasas, incluyendo, sin limitación, endopeptidasas aspárticas (por ej., catepsina D, quimosina, proteasa VIH), cisteína endopeptidasas (bromelainas, papaína, calpaína), metaloendopeptidasas, (por ej., collagenasa, termolisina), serina endopeptidasas (por ej., quimotripsina, factor IXa, factor X, trombina, tripsina), estreptocinasas. Las secuencias del sitio de reconocimiento y escisión para estas enzimas son conocidas.

En el caso de que se use dicho sitio de escisión, se puede introducir en una poliproteína E3 que comprende al menos los restos 1-60, tales como los restos 1-61 ó 1-62 de la SEC ID N°: 20 o una variante de la misma con al menos 80% de identidad de secuencia o al menos 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95% o 98% de identidad de secuencia al correspondiente número de restos de la SEC ID N°: 20, fusionados directamente en el C-terminal a dicha secuencia de escisión, que a su vez se fusiona a la parte E2 de la poliproteína. Preferiblemente, la parte E2 de la poliproteína es cualquiera de las realizaciones como se definió en la presente memoria anteriormente.

Las secuencias de proteína E2 de la invención incluyen las variantes de la SEC ID N°: 1 en que la 160X es como se definió en la siguiente Tabla y la proteína es como se presenta en la SEC ID N°: 1 aparte de los siguientes restos 70, 76 y 159 y 160, que son como sigue:

SEC ID N°:	70	76	159	160X
3	E	K	E	G
4	E	E	E	G
5	E	K	E	Δ
6	E	E	E	Δ
7	K	K	E	G
8	K	K	E	Δ
9	K	E	E	G
10	K	E	E	Δ
11	K	E	K	G
12	K	E	K	Δ
13	E	K	K	G
14	E	K	K	Δ
15	E	E	K	G
16	E	E	K	Δ

Opcionalmente, cada una de las secuencias anteriores puede comprender uno o más cambios adicionales a la SEC ID N°: 1 con los restos 71-75 de la SEC ID N°: 1 que son iguales o puede tener una o dos sustituciones que no afecten a la capacidad de la variante para infectar las CD, pero no modifiquen el número de aminoácidos en esta región.

Las secuencias de proteína E2 adicionales de la invención comprenden la SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 13 o SEC ID N°: 15 en que el resto 160 es Ala, Ile, Leu o Val en vez de Gly. Dichas variantes también pueden comprender los restos 71-75 de la SEC ID N°: 1 que son iguales o pueden tener una o dos sustituciones que no afecten a la capacidad de la variante para infectar las CD, pero no modifiquen el número de aminoácidos en esta región.

Opcionalmente la secuencia E2 de las SEC ID Nos: 3-15 o las variantes adicionales descritas en los dos párrafos anteriores, se pueden variar en otras posiciones para proporcionar una secuencia E2 con al menos 80% de identidad de secuencia para la SEC ID N°: 1. "Al menos 80% de identidad de secuencia" incluye una identidad de secuencia cualquiera de al menos 82%, 85%, 87%, 90%, 92%, 95% o 98%.

En las realizaciones anteriores, el primer resto E2, que corresponde a la posición 66 de la SEC ID N°: 20, puede ser Ser.

Como se indicó anteriormente, las secuencias E2 de la invención, incluyendo cualquiera de las SEC ID Nos: 3-15 y las variantes de las mismas descritas en los tres párrafos precedentes, se pueden expresar a partir de una poliproteína que comprende al menos una secuencia E3/E2 y preferiblemente una secuencia de poliproteínas E3/E2/6K/E1 de Sindbis. La secuencia de poliproteínas E3 en cada una de las realizaciones puede ser la de los restos 1-65 de la SEC ID N°: 20 o cualquiera de las variantes de la misma descritas anteriormente, incluyendo las variantes con un sitio de escisión no natural.

Sumario de la invención

Esta solicitud de patente se refiere a vectores lentivíricos pseudotipificados que comprenden un genoma con una secuencia de interés y una envoltura que comprende una glucoproteína de un arbovirus. La glucoproteína de arbovirus puede ser de virus Sindbis, virus del Dengue y virus de la encefalitis equina venezolana. En particular, cuando la glucoproteína es una proteína E2 de virus Sindbis, la proteína E2 tiene al menos una modificación de aminoácidos en el resto 160 comparado con una SEC ID N°: 1. La modificación de aminoácidos puede ser una supresión o un aminoácido distinto de ácido glutámico. La glucoproteína E2 puede ser alternativamente una proteína variante que tiene al menos 80% de identidad de secuencia para la SEC ID N°: 1 y también presenta una modificación del resto 160 que es una supresión o un aminoácido distinto de ácido glutámico. La glucoproteína facilita la infección de células dendríticas. En todos los casos la glucoproteína E2 no es parte de una proteína de fusión con virus Sindbis E3. En algunas realizaciones, la glucoproteína E2 o variante se une a CD-SIGN. El vector lentivírico también comprende un genoma lentivírico que comprende una secuencia de interés.

En algunas realizaciones, el resto 160 está ausente o es glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina. En una realización, el resto 160 es glicina. Además pueden tener lugar otras modificaciones de glucoproteína E2 en combinación con las modificaciones mencionadas del resto 160. Dicha modificación es un cambio de un aminoácido para reducir la carga positiva neta de E2. Una manera de reducir la carga positiva neta es cambiar una de las lisinas para un aminoácido que no es básico. En realizaciones particulares, se modifica una o más de lisina 70, lisina 76 o lisina 159. En algunas realizaciones, se cambia una o más de estas lisinas a un ácido glutámico o un ácido aspártico. En realizaciones específicas, la glucoproteína E2 es una de las SEC ID Nos: 3-16. Ejemplos de combinaciones de modificaciones incluyen, sin limitación, una modificación de ácido glutámico en la posición 160 y la modificación de una o más de lisina 70, lisina 76 o lisina 159 a un resto no básico. También se pueden realizar otras modificaciones, en combinación con la modificación del resto 160 y opcionalmente cualquiera de las otras modificaciones desveladas en la presente memoria. Por ejemplo, cualquiera de las glucoproteínas E2 mencionadas previamente puede comprender opcionalmente una o más sustituciones, inserciones o supresiones más. Como un ejemplo específico, el sitio de escisión de proteínas entre E2 y E3 puede ser la secuencia natural o una secuencia modificada que se escinde por una endopeptidasa diferente. En otras realizaciones, que pueden estar en combinación con cualquiera de las anteriores, la secuencia de restos 71-75 de la SEC ID N°: 1 es igual o presenta una o dos sustituciones de aminoácidos que no afectan a la capacidad de la variante para infectar las CD.

En algunas realizaciones, el genoma de vector lentivírico de cualquiera de las partículas víricas anteriores comprende una secuencia de interés que codifica un antígeno específico del tumor o un antígeno derivado de virus, tal como un antígeno de VIH o VIS. En algunas realizaciones, cualquiera de las partículas del vector descritas se produce a un título de al menos 10^5 /ml UI.

En otro aspecto, se proporciona un sistema de empaquetamiento de vector lentivírico para producir una partícula de vector lentivírico pseudotipificado, que comprende: una primera molécula de ácido nucleico que codifica una glucoproteína E2 de virus Sindbis de la SEC ID N°: 1 en que el resto 160 está ausente o un aminoácido distinto de ácido glutámico o una variante de la misma capaz de infectar células dendríticas con al menos 80% de identidad de

secuencia para la SEC ID N°: 1 y en que el resto 160 está ausente o es un aminoácido distinto de ácido glutámico, una segunda molécula de ácido nucleico que codifica proteínas gag y pol; una tercera molécula de ácido nucleico que codifica rev y un genoma de vector lentivírico que comprende una secuencia de interés. La glucoproteína E2 o variante del sistema de empaquetamiento presenta una secuencia de aminoácidos como se definió en cualquiera de las realizaciones anteriores. En algunas realizaciones, la proteína pol tiene una integrasa no funcional. En una realización particular, la integrasa no funcional tiene una mutación D64V. En algunas realizaciones, la segunda molécula de ácido nucleico es un genoma lentivírico no integrante. En realizaciones particulares, el sitio *att* muta o se suprime o el sitio PPT muta o se suprime o ambos. El genoma lentivírico no integrante se puede usar en asociación con una integrasa no funcional y en combinación con cualquiera de las proteínas E2 o las variantes. Se prefiere que se produzcan las partículas del vector lentivírico a un título de al menos 10^5 UI/ml. En algunos casos, se transfecta una célula con las moléculas de ácido nucleico primera y cuarta descritas anteriormente. La célula puede comprender ya las moléculas de ácido nucleico segunda y tercera, en una transformación estable.

Se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la glucoproteína como se describió anteriormente o una glucoproteína E3/E2 opcionalmente en la forma de una poliproteína Sindbis E3/E2/6K/E1 o una glucoproteína E3/E2 en la que la secuencia E3 corresponde a los restos 1-65 de la SEC ID N°: 20 o una variante de la misma con al menos 80% de identidad de secuencia para los restos 1-65 de la SEC ID N°: 20, en la que los restos 62-65 son RSKR (SEC ID N°: 27) y la variante es capaz de incorporarse a una envoltura vírica pseudotipificada, opcionalmente además en la que el resto 1 de la poliproteína E2 es Ser. La glucoproteína E2 puede ser cualquiera de las variantes descritas anteriormente, incluyendo las combinaciones de modificaciones. Además, se proporciona un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico, ya que es una célula huésped que comprende el vector de expresión.

Se proporciona un método para preparar una partícula de vector lentivírico de una cualquiera de las variantes o combinaciones anteriores, que comprende expresar en una célula una primera molécula de ácido nucleico que codifica una glucoproteína E2 de virus Sindbis de la SEC ID N°: 1 en que el resto 160 es distinto de ácido glutámico o una variante de la misma capaz de infectar células dendríticas con al menos 80% de identidad de secuencia para la SEC ID N°: 1 y en que el resto 160 está ausente o es un aminoácido distinto de ácido glutámico y (ii) una segunda molécula de ácido nucleico en la que se puede transcribir la segunda molécula de ácido nucleico y la transcripción reunida en una partícula de vector lentivírico pseudotipificado.

Cualquiera de las partículas de vector lentivírico se puede usar en un método de tratamiento de un ser humano o individuo animal. El tratamiento puede ser una vacuna para inmunización, en que la vacuna es profiláctica o terapéutica. Una vacuna comprende la partícula de vector lentivírico con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, se pueden administrar partículas de vector lentivírico a células in vitro, que comprenden la mezcla de las células con cualquiera de las partículas de vector lentivírico anteriores.

Estos y otros aspectos de la presente invención llegarán a ser evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una alineación de secuencias de la proteína de envoltura para cuatro envolturas de virus Sindbis, SVGmu, SIN-Var1, SIN-Var2 y SIN-Var3. La alineación se muestra relativa a SVGmu, una envoltura de Sindbis descrita previamente. Las principales diferencias para SVGmu incluyen la regeneración del sitio de escisión de proteasas tipo furina (RSKR; SEC ID N°: 27) entre E3 y E2, eliminación de la etiqueta epítipo de HA y una serie de sustituciones de lisina para reducir unión de heparina.

La Figura 2 es un esquema de vectores ejemplares usados en partículas víricas de empaquetado.

La Figura 3 presenta gráficos de títulos de sobrenadante bruto de preparaciones de partículas de vector lentivírico en que el genoma del vector se pseudotipificó con tres proteínas diferentes de envoltura de virus Sindbis, SVGmu y SIN-HR. Se generaron sobrenadantes de virus por transfección transitoria usando métodos clásicos y se recogieron 48 horas post transfección. Los títulos se determinaron sobre células 293T que expresan CD-SIGN humanas (293T-CD-SIGN). Los títulos se expresan como el número de unidades que expresan GFP por ml de sobrenadante y son medios de tres transfecciones independientes. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

Las Figuras 4A, 4B y 4C son gráficos que muestran respuestas inmunológicas de células T en ratones después de administración de partículas de vector lentivírico pseudotipificado. (A) Se inmunizaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea con una de dos dosis (indicado en ng p24) de OVA que codifica un vector lentivírico deficiente de integración. El número y la función de células T CD8 específicas de OVA257 en el bazo se determinaron el día 9 por multímero CPH-I/péptido y tinción intracelular de citocinas. (B) Se inmunizaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea con un intervalo de administración de OVA que codifica un vector lentivírico deficiente de integración. El porcentaje de células T CD8 específicas de OVA257 en el bazo se determinó el día 11 por tinción de multímero CPH-I/péptido. (C) Se inmunizaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea con un intervalo de administración de OVA que codifica un vector lentivírico deficiente de integración. El porcentaje de células T CD8 específicas de OVA257 en el bazo se

determinó el día 9 por tinción intracelular de citocinas.

La Figura 5A presenta dibujos de genomas lentivíricos ejemplares. La Figura 5B presenta secuencias de la región U3 de tres construcciones de vectores. (A) Los elementos contenidos en todos los vectores lentivíricos se muestran en el genoma del vector ejemplar en la parte superior. Los activadores utilizados incluyen el activador de Ubiquitina-C humana (UbiC), el activador temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) o el activador de virus del sarcoma de Rous (RSV, por sus siglas en inglés). Además de la región SIN U3 estándar, se muestra una serie de supresiones extendidas. Las alineaciones de secuencias de las regiones U3 de todos los 3 vectores se muestran en (B). La secuencia mostrada incluye el tramo de polipurina (PPT), que es suprimida en la construcción 704 y la supresión U3 extendida presente en ambas construcciones 703 y 704.

Las Figuras 6A y 6B muestran la expresión GFP de vector lentivírico después de transducción de células 293T. En la Figura 6A, GFP se unió de manera operativa a un activador de UbiC y en la Figura 6B, GFP se unió de manera operativa a un activador de CMV. Se determinaron los niveles de expresión de GFP de vectores lentivíricos deficientes en integrasa 48 h después de transducción de CD-SIGN que expresa células 293T. La expresión de GFP en células transducidas se determinó por métodos de flujo citométrico clásicos; un total de 50.000 procesos se recogió de cada mezcla de células transducidas para determinar niveles medios de expresión.

La Figura 7 muestra el número de células positivas de GFP durante cinco pases. Las células se transdujeron con diferentes preparaciones de vectores y se pasaron cada 72 h. Los títulos GFP relativos se determinaron en cultivos de células 293T transducidos con diferentes construcciones NILV. Se empaquetaron vectores usando Integrasa de tipo natural (IN+) o una Integrasa mutante D64V (IN-) y se usaron para transducir CD-SIGN que expresa células 293. Después se pasaron los cultivos de células transducidos cada 72 horas durante 15 días. En cada pase, el número de células GFP+ en el cultivo se determinó usando métodos de flujo citométrico clásicos. La pérdida de expresión de GFP con el pase indica pérdida de episomas de vectores con el tiempo.

La Figura 8 muestra respuesta de células T CD8 después de administración de vector lentivírico de integración (Int^{wt}) o no integración (Int^{D64V}). Se inmunizaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea con $2,5 \times 10^{10}$ genomas de vector lentivírico de integración (Int^{wt}) o no integración (Int^{D64V}) que codifican el antígeno Gag de virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS). Se determinó el número de células T específicas del antígeno en el bazo y su perfil de secreción de citocinas el día 10 por tinción intracelular de citocinas.

La Figura 9 presenta gráficos que muestran el tamaño de tumores en ratones que reciben vehículo solo o partículas víricas que codifican un antígeno tumoral (gráfica izquierda) y porcentaje de supervivencia (gráfica derecha). Se inyectaron ratones BALB/c por vía subcutánea con 2×10^4 células de carcinoma de colon CT26. Un día después, los ratones se trataron por vía subcutánea con vehículo o 3,2 μg (cápside p24) de vector lentivírico no integrante que fija como objetivo CD (CD-NILV) que codifica el péptido AH1A5 (SPSYAYHQF; SEC ID N°: 25), un epítipo de células T CT26 CD8. Se representa el crecimiento tumoral inicial y la supervivencia a largo plazo de ratones vacunados frente al de control.

Descripción detallada

La presente descripción proporciona métodos y composiciones para células dendríticas diana (las CD) usando una partícula de vector lentivírico (por ej., un virión, una partícula lentivírica) para suministrar una secuencia de interés a las CD. La partícula de vector lentivírico comprende una variante de glucoproteína de envoltura derivada de virus Sindbis E2 y un genoma que comprende la secuencia de interés y opcionalmente otros componentes. La variante de glucoproteína presenta unión reducida a sulfato de heparán comparado con HR, una cepa de virus Sindbis de referencia. La glucoproteína de envoltura facilita la infección de células dendríticas por las partículas de vector lentivírico. "Facilita" la infección, como se usa en la presente memoria, es lo mismo que facilita la transducción y se refiere a la función de la glucoproteína de envoltura, que actúa sola o de acuerdo con otras moléculas, en la activación o mejora de entrada mediada por receptor de una partícula de retrovirus o lentivirus pseudotipificada en una célula diana.

En general, las partículas de vector lentivírico se producen por una estirpe celular que contiene uno o más vectores plásmidos y/o elementos integrados que codifican juntos los componentes necesarios para generar partículas de vector funcionales. Estas partículas de vector lentivírico no son típicamente competentes para replicación, es decir, son sólo capaces de una sola vuelta de infección. Lo más frecuentemente, se utilizan múltiples vectores plásmidos o casetes de expresión individuales integrados de manera estable en el cromosoma celular productor para separar los diversos componentes genéticos que generan las partículas de vector lentivírico, sin embargo, se puede usar un solo vector plásmido con todos los componentes lentivíricos. En una ejemplificación, la estirpe de empaquetamiento se transfecta con uno o más plásmidos que contienen el genoma de vector vírico, incluyendo las LTR, una secuencia de empaquetamiento que actúa en cis y la secuencia o las secuencias de interés, al menos un plásmido que codifica los componentes enzimáticos y estructurales del virus (por ej., gag y pol) y al menos un plásmido que codifica una glucoproteína de envoltura de Arbovirus. Las partículas víricas brotan a través de la membrana celular y comprenden un núcleo que incluye típicamente dos genomas de ARN que contienen la secuencia de interés y una glucoproteína de envoltura de Arbovirus que fija como objetivo células dendríticas. Cuando la glucoproteína de Arbovirus es una glucoproteína E2 de virus Sindbis, se logra que la glucoproteína presente unión reducida a sulfato

de heparán comparado con la HR de la cepa de referencia. Esto normalmente implica al menos un cambio de aminoácidos comparado con la secuencia de glucoproteínas E2 de HR.

Sin desear estar limitados por la teoría, se cree que la unión de la partícula vírica a una superficie celular induce endocitosis, llevando el virus a un endosoma, provocando la fusión de la membrana y permitiendo que el núcleo del virus entre en el citosol. Para ciertas realizaciones, que utilizan la integración de partículas del vector lentivírico, después de transcripción inversa y migración del producto al núcleo, el genoma del virus se integra en el genoma de la célula diana, incorporando la secuencia o las secuencias de interés en el genoma de la célula diana. Para reducir la posibilidad de mutagénesis por inserción y activar la expresión transitoria de un antígeno o antígenos diseñados, sin embargo, otras realizaciones utilizan partículas no integrantes del vector lentivírico, que no se integran en el genoma de la célula diana, pero en su lugar expresan la secuencia o las secuencias de interés de un episoma. De cualquier modo, la CD infectada expresa entonces la secuencia o las secuencias de interés, por ej., un antígeno, una molécula estimuladora. El antígeno puede ser tratado después por las células dendríticas y presentado a células T y B, generando una respuesta inmunitaria específica del antígeno. No se requiere la ruta específica descrita anteriormente siempre que la célula dendrítica sea capaz de estimular una respuesta inmunitaria específica del antígeno.

Las partículas víricas se pueden administrar a un individuo para proporcionar un efecto profiláctico o terapéutico. El producto de la secuencia de interés es típicamente un antígeno de un agente causante de enfermedad o una célula enferma (por ej., célula tumoral). Después de la infección de las células dendríticas y expresión del producto, se genera una respuesta inmunitaria al producto. La respuesta inmunitaria puede ser humoral o celular o ambas.

A. Envoltura del vector vírico

Los virus transmitidos por los artrópodos (Arbovirus) son virus que son transmitidos a un huésped, tales como seres humanos, caballos o pájaros por un vector de artrópodo infectado tal como un mosquito. Los arbovirus se dividen además en subfamilias de virus incluyendo alfavirus y flavivirus, que tienen un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva y una envoltura que contiene glucoproteína. Por ejemplo, el virus de la fiebre del dengue, el virus de la fiebre amarilla y el virus del Nilo Occidental pertenecen a la familia del flavivirus y virus Sindbis, el virus del bosque Semiliki y el virus de la Encefalitis Equina Venezolana, son miembros de la familia alfavirus (Wang et al. J. Virol. 66, 4.992 (1.992)). La envoltura de virus Sindbis incluye dos glucoproteínas transmembrana (Mukhopadhyay et al. Nature Rev. Microbio. 3, 13 (2.005)): E1, se cree que es responsable de la fusión y E2, se cree que es responsable de la unión celular. Las glucoproteínas de envoltura del virus Sindbis son conocidas para pseudotipificar otros retrovirus, incluyendo oncoretrovirus y lentivirus.

Como se discutió anteriormente, se puede usar una glucoproteína de envoltura de arbovirus para pseudotipificar un genoma de vector con base lentivírica. Un lentivirus "pseudotipificado" es una partícula lentivírica que tiene una o más glucoproteínas de envoltura que están codificadas por un virus que es distinto del genoma lentivírico. La glucoproteína de envoltura se puede modificar, mutar o lograr como se describe en la presente memoria.

La envoltura de virus Sindbis y otros alfavirus se incorpora a la bicapa lipídica de la membrana de la partícula vírica y típicamente incluye múltiples copias de dos glucoproteínas, E1 y E2. Cada glucoproteína tiene regiones de expansión de membrana; E2 tiene un dominio citoplasmático de aproximadamente 33 restos mientras la cola citoplasmática de E1 es muy corta (aproximadamente 2 restos). Tanto E1 como E2 tienen ácidos palmíticos unidos a, o cerca de, las regiones de expansión de membrana. E2 se sintetiza inicialmente como una proteína precursora que se escinde por furina u otra Serina proteinasa dependiente de Ca^{2+} en E2 y una glucoproteína pequeña denominada E3. Situada entre las secuencias que codifican E2 y E1 hay una secuencia que codifica una proteína denominada 6K. E3 y 6K son secuencias de señal que sirven para traslocar las glucoproteínas E2 y E1, respectivamente, en la membrana. En el genoma del virus Sindbis, la región codificadora para proteínas de envoltura de Sindbis incluye secuencia que codifica E3, E2, 6K y E1. Como se usa en la presente memoria, la "envoltura" de un virus arbovirus incluye al menos E2 y también puede incluir E1, 6K y E3. Una secuencia ejemplar de glucoproteínas de envoltura de virus Sindbis, cepa HR, se presenta como la SEC ID N°. 17. Las secuencias de glucoproteínas de envoltura para otros arbovirus se pueden encontrar por ej., en GenBank. Por ejemplo, la secuencia que codifica las glucoproteínas del virus del Dengue se puede encontrar en el Acceso GQ252677 (entre otros en GenBank) y en la base de datos de variación de virus en NCBI y la secuencia que codifican glucoproteínas de envoltura del virus de la encefalitis equina venezolana en el Acceso NP 040824.

Aunque el receptor o los receptores celulares en las células dendríticas para alfavirus y virus Sindbis en particular, no se han identificado definitivamente hasta la fecha, un receptor parece ser CD-SIGN (Klimstra et al., J Virol 77: 12.022, 2.003). El uso de los términos "adhesión", "unión", "fijar como objetivo" y similares se usan indistintamente y no están destinados a indicar un mecanismo de la interacción entre glucoproteína de envoltura de virus Sindbis y un componente celular. El CD-SIGN (No Integrina Capturadora de ICAM-3 (Moléculas de Adhesión Intracelular 3) Específica de Células Dendríticas; también conocida como CD209) es receptor similar a lectina de tipo C capaz de unirse rápido y endocitosis de materiales (Geijtenbeek, T. B., et al. Annu. Rev. Immunol. 22: 33-54, 2.004). Parece que E2 fija como objetivo el virus a células dendríticas a través de CD-SIGN. Como se muestra en la presente memoria, las células que expresan CD-SIGN son transducidas por partículas del vector vírico pseudotipificadas con E2 de virus Sindbis mejor (al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6

veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces o al menos 10 veces mejor) que las células isogénicas que no expresan CD-SIGN. El mecanismo de cómo la glucoproteína E2 facilita la infección vírica parece que implica CD-SIGN, posiblemente a través de unión directa a CD-SIGN o que causa un cambio en la conformación o algún otro mecanismo. Sin tener en cuenta el mecanismo real, la fijación como objetivo por E2 es preferente para células que expresan CD-SIGN, esto es células dendríticas.

También parece que el virus Sindbis se une a células vía sulfato de heparán (Klimstra et al., J Virol 72: 7.357, 1.998; Burmes y Griffin, J Virol 72: 7.349, 1.998). Debido a que el sulfato de heparán y otros glucosaminoglucanos de superficie celular se encuentran en la superficie de la mayoría de los tipos de células, es deseable reducir la interacción entre sulfato de heparán y glucoproteínas de envoltura Sindbis. Esto se puede llevar a cabo por disminución de la unión de envoltura de virus Sindbis a sulfato de heparán o aumento de la unión, por ej., aumentando avidéz, de envoltura de virus Sindbis a células dendríticas o ambos. Como resultado, la unión no específica a otras moléculas, que se puede expresar por otros tipos de células y que puede tener lugar incluso si la envoltura es específica para CD-SIGN, se reduce, y la especificidad mejorada puede servir para evitar efectos secundarios no deseados, tales como efectos secundarios que pueden reducir la respuesta inmunitaria deseada o los efectos secundarios asociados a transducción fuera del objetivo de otros tipos de células. Alternativamente o además de las ventajas de transducción relativamente específica de células que expresan CD-SIGN, las partículas víricas pseudo-tipificadas con glucoproteína E2 de envoltura de virus Sindbis pueden ofrecer otras ventajas sobre las partículas víricas pseudo-tipificadas con glucoproteínas tales como VSVG. Ejemplos de dichas ventajas incluyen lisis mediada por complemento reducida y/o fijación como objetivo de neuronas reducida, ambas de las cuales se cree que se asocian a la administración de partículas víricas pseudo-tipificadas de VSV-G.

En diversas ejemplificaciones, las partículas de vector lentivírico se unen específicamente a células que expresan CD-SIGN y presentan unión reducida o anulada a sulfato de heparán. Esto es, se puede modificar una glucoproteína E2 de envoltura de virus Sindbis para dirigir preferentemente el virus a células dendríticas que expresen CD-SIGN con respecto a otros tipos de células. Basándose en la información obtenida de estudios estructurales y modelado molecular entre otros estudios, se diseñan secuencias de variante de proteínas de envoltura, especialmente glucoproteínas E2 y E1, y se generan de manera que las glucoproteínas mantengan sus funciones como proteínas de envoltura, pero tengan la especificidad de unión, avidéz o nivel de unión deseado. Se pueden crear secuencias de variantes candidatas para cada glucoproteína y ensayar usando los métodos descritos a continuación u otros métodos conocidos en la técnica, para identificar glucoproteínas de envoltura con las características más deseables.

Algunas secuencias de variantes de E2 Sindbis presentan al menos una modificación de aminoácidos en el resto 160 cuando se compara con la SEC ID N°: 1. Se suprime o se cambia el resto 160 a un aminoácido distinto de ácido glutámico. Una modificación es lo más comúnmente una sustitución de al menos un aminoácido, pero alternativamente puede ser una adición o supresión de uno o más aminoácidos. Preferiblemente, todos los aminoácidos adicionales son pocos en número y no comprenden un epítipo antigénico (por ej., secuencia de tag hemaglutinina), que puede comprometer la seguridad. Cuando hay dos o más modificaciones, ambas pueden ser del mismo tipo (por ej., sustitución) o tipos diferentes (por ej., una sustitución y una supresión). Se pueden dispersar o situar de manera contigua múltiples modificaciones en la secuencia proteínica.

En el primer caso, las secuencias de variantes comprenden al menos una modificación de aminoácidos en la región de aproximadamente el resto 50 a aproximadamente el resto 180. Dentro de esta región son los aminoácidos los que están implicados en la unión a sulfato de heparán. Reduciendo la carga positiva neta de E2, se puede reducir la interacción electrostática con sulfato de heparán, dando como resultado unión disminuida a sulfato de heparán. Los aminoácidos cargados positivamente candidatos en esta región incluyen lisinas en los restos 63, 70, 76, 84, 97, 104, 129, 131, 133, 139, 148, 149, 159 y arginina en los restos 65, 92, 128, 137, 157, 170, 172 (Bear et al., Virology 347: 183-190, 2.006). Al menos varios de estos aminoácidos están implicados directamente en la unión de E2 a sulfato de heparán. La carga positiva neta se puede reducir por supresión de lisina o arginina o sustitución de lisina o arginina con un aminoácido neutro o cargado de manera negativa. Por ejemplo, una o más de estas lisinas y argininas se pueden reemplazar con ácido glutámico o aspártico. Algunas realizaciones presentan al menos una sustitución de lisina 70, 76 ó 159. En los casos en que E2 se expresa como una poliproteína con E3, se mantiene la lisina situada adyacente al sitio de unión E3/E2 natural – esto es, la secuencia de reconocimiento y el sitio de escisión no se modifican. Alternativamente, la secuencia del sitio de escisión de endopeptidasa natural se reemplaza con una secuencia de reconocimiento para una endopeptidasa diferente.

Algunas de las variantes de E2 también se pueden modificar de una manera que influya de manera positiva en la unión a células dendríticas. La modificación del ácido glutámico encontrado en el resto 160 en la secuencia HR de referencia puede mejorar la unión a células dendríticas (véase Gardner et al., J Virol 74, 11.849, 2.000). las modificaciones, tales como una supresión del resto 160 o sustitución del resto 160 se encuentran en algunas variantes. En variantes particulares, un aminoácido no cargado es sustituido por Glu, en otras variantes, un aminoácido no ácido es sustituido por Glu. Típicamente, Glu160 se reemplaza con uno de los aminoácidos pequeños o alifáticos, incluyendo glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina.

Otras variantes comprenden dos o más modificaciones de aminoácidos. Típicamente en estas variantes una de las modificaciones es Glu160 y la modificación o las modificaciones restantes son cambios de una o más de las lisinas y argininas en el resto aproximadamente 50 a aproximadamente 180 de expansión de la región. Algunas de las

variantes comprenden una modificación de Glu160 en un resto no ácido o supresión y una o más modificaciones de lisina 70, lisina 76 o lisina 159 con un aminoácido no básico. Algunas variantes específicas comprenden una Glu160 a Gly, Lys 70 a Glu y Lys 159 a Glu; una Glu 160 a Gly, Lys 70, 76 y 159 a Glu; una supresión de Glu 160 y Lys 70 y 159 a Glu y una supresión de Glu 160 y Lys 70, 76 y 159 a Glu.

En algunos casos, la proteína E2 primero se expresa como una poliproteína en fusión con al menos E3 o en fusión con una secuencia líder. Sin tener en cuenta si la secuencia líder es E3 u otra secuencia, E2 en la envoltura vírica debería estar exenta de la E3 u otra secuencia líder. En otras palabras, E2 no es preferiblemente una proteína de fusión E3/E2 (por ej., la proteína de fusión E3/E2 denominada SVGmu). En algunas realizaciones, E2 se expresa como parte de la poliproteína E3-E2-6K-E1. El virus Sindbis se expresa de manera natural E2 como parte de una poliproteína y las regiones de unión para E3/E2, E2/6K y 6K/E1 presentan secuencias reconocidas y escindidas por endopeptidasas. Normalmente, la unión E3/E2 es escindida por furina o una serina endopeptidasa tipo furina entre los restos 65 y 66. La furina presenta especificidad por restos arginina apareados que están separados por dos aminoácidos. Para mantener la escisión E3/E2 por furina, los restos 62-66 (RSKRS; SEC ID N°: 26) deberían mantener los dos restos arginina con separación de dos aminoácidos y el resto serina. Alternativamente, se puede usar una secuencia de escisión diferente en vez de la secuencia de escisión de furina E3/E2 o cualquiera de las otras secuencias de escisión. Los sitios de reconocimiento y escisión pueden ser incorporados por endopeptidasas, incluyendo, sin limitación, endopeptidasas aspárticas (por ej., catepsina D, quimosina, proteasa VIH), cisteína endopeptidasas (bromelaínas, papaína, calpaína), metaloendopeptidasas, (por ej., collagenasa, termolisina), serina endopeptidasas (por ej., quimotripsina, factor IXa, factor X, trombina, tripsina), estreptocinasas. Las secuencias del sitio de reconocimiento y escisión para estas enzimas son conocidas.

También se pueden modificar aminoácidos en E2, distintos de los ya mencionados. En general, una secuencia de variante E2 tendrá al menos el 80% de identidad de secuencias de aminoácidos para la secuencia de referencia E2 o puede tener al menos 82%, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95% o al menos 98% de identidad de secuencia. La glucoproteína de la variante debería presentar función biológica, tal como la capacidad para facilitar la infección de células dendríticas por una partícula vírica con una envoltura que comprende E2. Los experimentos han identificado regiones de glucoproteínas de envoltura que parecen tener una función importante en diversos aspectos de conjunto vírico, adhesión a superficie celular e infección. Cuando se preparan las variantes, se puede usar la siguiente información como directrices. La cola citoplasmática de E2 - aproximadamente los restos 408 a 415 - es importante para el conjunto vírico (West et al. J Virol 80: 4.458-4.468, 2.006. Otras regiones están implicadas en la formación de estructura secundaria (aproximadamente los restos 33-53) y están implicadas en el transporte y la estabilidad de la proteína (aproximadamente los restos 86-119) (Navaratmarajah et al., J Virol 363: 124-147, 2.007. La variante puede retener carácter hidrófobo de una región que expande la membrana, aproximadamente los restos 370-380. La variante puede retener uno o los dos restos de los sitios de glucosilación ligados a N NIT (restos 196-198) y NFT (restos 318-320) y puede retener uno o más de los sitios que están palmitoilados (C-396, C416 y C417) (Strauss y Strauss Microbiol Rev 58, 491-562, 1.994; págs. 499-509). Por otra parte, muchas regiones de E2 se pueden modificar sin proceso perjudicial. Por ejemplo, las inserciones de transposones en muchas diferentes posiciones en E2 aún dan como resultado virus viable (Navaratmarajah, ibídem).

En algunas realizaciones, se puede incorporar un péptido con etiqueta a las proteínas E3, 6K o E1. Para algunos fines, se puede incorporar una etiqueta a E2, pero no es deseable una etiqueta para uso en un producto para administración a pacientes humanos. Se puede usar un péptido con etiqueta, que es una secuencia corta (por ej., 5-30 aminoácidos), para facilitar la detección de expresión de la envoltura y su presencia en partículas víricas. Para los fines de detección, una secuencia de etiqueta será detectable típicamente por anticuerpos o productos químicos. Otro uso para una etiqueta es facilitar la purificación de partículas víricas. Se puede usar un sustrato que contiene una pareja de unión para la etiqueta para absorber el virus. La elución del virus se puede llevar a cabo por tratamiento con un resto que desplaza la etiqueta de la pareja de unión o cuando la secuencia de la etiqueta está ligada con una secuencia escindible, el tratamiento con la endopeptidasa apropiada permitirá convenientemente la liberación de virus. (Véase, por ejemplo, Qiagen catalog, Factor Xa Protease System). La eliminación del péptido con etiqueta es en general deseable para fines de seguridad del uso de partículas víricas en individuos animales. Si no se retira la etiqueta, puede tener lugar una respuesta inmunitaria a la etiqueta.

Las etiquetas adecuadas incluyen, sin limitación, FLAG (DYKDDDDK) (Patente de EE.UU. N° 4.703.004, para las que los anticuerpos están comercialmente disponibles, proteína de unión a quitina, proteína de unión a maltosa, glutatión-S-transferasa, poli(His) (Patente de EE.UU. N° 4.569.794), tiorredoxina, etiqueta de HA (hemaglutinina), entre otros. Poli(His) puede ser adsorbido en medio de afinidad que contiene iones metálicos ligados, por ej., níquel o cobalto y se eluye con un medio de pH bajo.

Se pueden evaluar las partículas víricas para determinar la especificidad de la glucoproteína de envoltura incorporada al virus que fija como objetivo células dendríticas. Por ejemplo, se puede obtener una población mixta de células de médula ósea de un individuo y cultivar in vitro. Alternativamente, se pueden obtener y usar estirpes celulares isogénicas que expresan o no expresan CD-SIGN. El virus recombinante se puede administrar a la población mixta de células de médula ósea o estirpes celulares isogénicas y se puede ensayar la expresión de un gen indicador incorporado al virus en las células cultivadas. Algunas realizaciones pueden emplear un análisis de dilución limitante, en que la población mixta de células se divide en partes separadas, que se incuban después por

separado con cantidades decrecientes de virus (por ej., 2 veces, 5 veces, 10 veces menos de virus en cada parte). En algunas realizaciones, al menos aproximadamente 50%, más preferiblemente al menos aproximadamente 60%, 70%, 80% o 90%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de células infectadas en la población de células mixtas son células dendríticas que expresan CD-SIGN. En algunas realizaciones, la proporción de células dendríticas infectadas a células no dendríticas infectadas (o células que no expresan CD-SIGN) es al menos aproximadamente 2:1, al menos aproximadamente 3:1, al menos aproximadamente 4:1, al menos aproximadamente 5:1, al menos aproximadamente 6:1, al menos aproximadamente 7:1, al menos aproximadamente 8:1, al menos aproximadamente 9:1, al menos aproximadamente 10:1, al menos aproximadamente 20:1, al menos aproximadamente 30:1, al menos aproximadamente 40:1, al menos aproximadamente 50:1, al menos aproximadamente 100:1, al menos aproximadamente 200:1, al menos aproximadamente 500:1, al menos aproximadamente 1.000:1, al menos aproximadamente 5.000:1, al menos aproximadamente 10.000:1 o más. Para dilución limitante, se observa mayor selectividad típicamente a mayores diluciones (es decir, cantidades inferiores) de virus de entrada.

La actividad de partículas víricas pseudotipificadas se puede determinar por cualquiera de una variedad de técnicas. Por ejemplo, un método preferido para medir la eficacia de infectividad (UI, unidades infecciosas) es por administración de partículas víricas a células y medición de la expresión de un producto codificado en el genoma del vector. Se puede usar cualquier producto que se pueda ensayar. Un tipo de producto conveniente es una proteína fluorescente, tal como proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés). La GFP y el ensayo se ejemplifican en los Ejemplos, tales como Ejemplo 3. Otros productos que se pueden usar incluyen proteínas expresadas en una superficie celular (por ej., detección por unión de anticuerpos), enzimas y similares. Si el producto es un antígeno y las células son células dendríticas, se puede evaluar la infectividad / actividad por determinación de una respuesta inmunitaria. Además, es posible determinar efectos secundarios en un mamífero. La capacidad para fijar como objetivo específicamente células dendríticas también se puede ensayar directamente, por ejemplo, en cultivo celular como se describe a continuación.

También se puede preparar y ensayar en partículas víricas su selectividad y/o su capacidad para facilitar la penetración de la membrana de la célula diana. Las partículas víricas que presentan una envoltura con glucoproteínas no modificadas se pueden usar como controles para comparación. En pocas palabras, las células que expresan un receptor para una glucoproteína de envoltura son infectadas por el virus usando un ensayo de infección clásico. Después de un tiempo especificado, por ejemplo 48 horas post-infección, se pueden recoger las células y el porcentaje de células infectadas por el virus se puede determinar por citometría de flujo, por ejemplo. La selectividad se puede puntuar por cálculo del porcentaje de células infectadas por virus. De manera similar, el efecto de una glucoproteína de envoltura de la variante sobre el título vírico se puede cuantificar dividiendo el porcentaje de células infectadas por virus que comprende una envoltura de la variante por el porcentaje de células infectadas por virus que comprenden la correspondiente glucoproteína de envoltura de cepa natural (no modificada). Una variante adecuada en particular tendrá la mejor combinación de selectividad y título infeccioso. Una vez que se selecciona una variante, se pueden realizar ensayos de concentración vírica para confirmar que estos virus se puedan concentrar sin comprometer la actividad. Se recogieron y se concentraron sobrenadantes víricos por ultracentrifugación. Los títulos de virus se pueden determinar por dilución limitada de disolución madre vírica e infección de células que expresan el receptor para la glucoproteína de envoltura, midiendo la expresión de un producto expresado por los virus como se describió anteriormente.

La entrada de una partícula de vector lentivírico en una célula diana es otro tipo de evaluación de actividad. Se ha utilizado proteína de fusión BlaM-Vpr (beta-lactamasa Vpr) para evaluar la penetración vírica VIH-1; se puede usar una fusión de BlaM y una glucoproteína de envoltura de virus Sindbis, tal como E1 o una proteína de fusión E2/E1 para evaluar la eficacia de una proteína de envoltura en facilitar la fusión y la penetración en una célula diana. Se pueden preparar partículas víricas, por ejemplo, por transfección transitoria de células de empaquetamiento con uno o más vectores que comprende los elementos víricos, BlaM-Vpr, y la envoltura de la variante de interés (y una molécula de afinidad si es apropiado). Los virus resultantes se pueden usar para infectar células que expresan una molécula la molécula que se fija como objetivo (o molécula de afinidad) se une específicamente en ausencia o presencia del inhibidor libre de unión (tal como un anticuerpo). Después se pueden lavar las células con medio independiente de CO₂ y se cargaron con colorante CCF2 (Aurora Bioscience). Después de incubación a temperatura ambiente para permitir la terminación de la reacción de escisión, se pueden fijar las células mediante paraformaldehído y se analizaron por citometría de flujo y microscopía. La presencia de células azules indica la penetración de virus en el citoplasma; se esperarían menos células azules cuando se añade anticuerpo de bloqueo (Cavrois et al. Nat Biotechnol 20: 1.151-1.154, 2.002).

Para investigar si la penetración depende de un pH bajo y para identificar glucoproteínas de envoltura con la dependencia del pH deseada, se puede añadir NH₄Cl u otro compuesto que modifique el pH a la etapa de infección (NH₄Cl neutralizará los compartimentos ácidos de los endosomas). En el caso de NH₄Cl, la desaparición de células azules indicará que la penetración de virus depende del pH bajo. Además, para confirmar que la actividad depende del pH, se pueden añadir agentes lisosomotrópicos, tales como cloruro de amonio, cloroquina, concanamida, bafilomicina A1, monensina, nigericina, etc., al tampón de incubación. Estos agentes elevan el pH dentro de los compartimentos endosomales (por ej., Droese y Altendorf, J. Exp. Biol. 200, 1-8, 1.997). El efecto inhibitorio de estos agentes revelará la función de pH para la fusión y la entrada vírica. Se pueden comparar las diferentes cinéticas de entrada entre los virus que muestran diferentes moléculas fusogénicas y lo más adecuado se seleccionan para una

aplicación particular.

Se pueden utilizar ensayos de entrada a base de PCR para controlar la transcripción inversa y medir la cinética de la síntesis de ADN vírica como una indicación de la cinética de entrada vírica. Por ejemplo, se incuban partículas víricas que comprenden una molécula de proteína de envoltura particular con células diana, tales como células 293T, las CD o cualquier otra célula que se haya logrado para que exprese o que exprese de manera natural, la pareja de unión apropiada (receptor) para la molécula de proteína de envoltura. Inmediatamente o después de un incremento de tiempo (para permitir que tenga lugar infección), se retiran los virus no ligados y se analizan alícuotas de las células para ácidos nucleicos víricos. Se extrae ADN de estas alícuotas y se someten a análisis de multiplicación, en general en un ensayo semi-cuantitativo, sensibilizado con cebadores específicos de LTR. La aparición de productos de ADN específico de LTR indica el éxito de la entrada vírica.

B. Genoma del vector lentivírico

La partícula del vector vírico comprende un genoma, que comprende la secuencia o las secuencias de interés. Se pueden incluir otras secuencias, tales como secuencias que permiten el genoma que se tiene que empaquetar en la partícula vírica y las secuencias que activan la expresión de la secuencia o las secuencias de interés después de transducción de la célula diana. El genoma puede ser derivado de cualquiera de un gran número de vectores a base de genoma lentivíricos disponibles, adecuados, incluyendo los identificados para aplicaciones de tratamiento de genes humanos, tales como los descritos por Pfeifer y Verma (Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2: 177-211, 2.001). Por simplicidad, el genoma también se refiere como "genoma del vector vírico" o "genoma del vector".

1. Cadena principal

Los genomas de vector lentivírico adecuados incluyen los basados en Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1), VIH-2, virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), virus de la anemia infecciosa equina, Virus de la Inmunodeficiencia del Simio (VIS) y virus del maedi/visna. Una característica deseable de los lentivirus es que pueden infectar células tanto divisorias como no divisorias, no es necesario que las células diana sean divisorias (o estimular que las células diana se dividan). En general, el genoma y las glucoproteínas de envoltura se basarán en diferentes virus, de manera que se pseudotipifique la partícula de vector vírico resultante. Los elementos de seguridad del genoma del vector son incorporados de manera deseable. Los elementos de seguridad incluyen LTR de auto-inactivación y un genoma no integrante. Se discuten vectores ejemplares además en el Ejemplo 5 y la Figura 5 y se pueden usar dichos vectores en realizaciones de la invención para expresión de antígenos de interés.

En algunas realizaciones ejemplares, el genoma vírico del vector comprende secuencias de un genoma lentivírico, tal como el genoma del VIH-1 o el genoma del SIV. La construcción del genoma vírico puede comprender secuencias de las LTR 5' y 3' de un lentivirus y en particular puede comprender las secuencias R y U5 de la LTR 5' de un lentivirus y una LTR 3' inactivada o auto-inactivada de un lentivirus. Las secuencias LTR pueden ser secuencias LTR de cualquier lentivirus de cualquier especie. Por ejemplo, pueden ser secuencias LTR de VIH, SIV, VIF o VIB. Típicamente, las secuencias LTR son secuencias LTR de VIH.

El genoma del vector puede comprender una LTR 3' inactivada o auto-inactivada (Zufferey et al. J Virol 72: 9.873, 1.998; Miyoshi et al., J Virol 72: 8.150, 1.998). Un vector auto-inactivante presenta, en general, una supresión del potenciador y secuencias activadoras de la repetición terminal larga 3' (LTR, por sus siglas en inglés), que se copia en la LTR 5' durante la integración del vector. En un caso, el elemento U3 de la LTR 3' contiene una supresión de su secuencia potenciadora, la caja TATA, los sitios Sp1 y NF-kappa B. Como resultado de la LTR 3' auto-inactivante, el provirus que se genera después de la entrada y transcripción inversa comprenderá una LTR 5' inactivante. La razón es para mejorar la seguridad por reducción del riesgo de movilización del genoma del vector y la influencia de la LTR en activadores celulares próximos. La LTR 3' auto-inactivante se puede construir por cualquier método conocido en la técnica.

Opcionalmente, la secuencia U3 de la LTR 5' lentivírica se puede reemplazar con una secuencia activadora en la construcción vírica, tal como una secuencia activadora heteróloga. Esto puede aumentar el título de virus recuperado de la estirpe celular de empaquetamiento. También se puede incluir una secuencia potenciadora. Se puede usar cualquier combinación de potenciador/activador que aumente la expresión del genoma vírico de ARN en la estirpe celular de empaquetamiento. En un ejemplo, se usa la secuencia potenciadora /activadora de CMV (patente de EE.UU. 5385839 y patente de EE.UU. 5168062).

En algunas realizaciones, se minimiza el riesgo de mutagénesis por inserción por construcción del genoma lentivírico del vector para que la integración sea deficiente. Se puede seguir una serie de propuestas para producir un genoma no integrante del vector. Estas propuestas implican lograr una mutación o mutaciones en el componente de enzima integrasa del gen *pol*, de manera que codifique una proteína con una integrasa inactiva. El propio genoma del vector se puede modificar para evitar la integración por, por ejemplo, mutación o supresión de uno o más sitios de adhesión o preparar el tramo de polipurina proximal (PPT, por sus siglas en inglés) de LTR 3' no funcional a través de supresión o modificación. Además, están disponibles propuestas no genéticas; éstas incluyen agentes farmacológicos que inhiben una o más funciones de la integrasa. Las propuestas no son mutuamente excluyentes, esto es, más de una de ellas se puede usar a la vez. Por ejemplo, tanto la integrasa como los sitios de adhesión

pueden ser no funcionales o la integrasa y el sitio PPT pueden ser no funcionales o los sitios de unión y el sitio PPT pueden ser no funcionales o todos ellos pueden ser no funcionales.

Como se indicó anteriormente, una propuesta es preparar y usar una integrasa no funcional. La integrasa está implicada en la escisión de ADN como bcatenarío vírico y unión de los extremos a 5'-fosfatos en las dos cadenas de un sitio diana cromosómico. La integrasa presenta tres dominios funcionales: dominio N-terminal, que contiene una unidad que se une a cinc (HHCC), el núcleo del dominio central, que contiene el núcleo catalítico y una unidad DD35E conservada (D64, D116, E152 en VIH-1) y un dominio C-terminal, que tiene propiedades de unión de ADN. Las mutaciones de punto introducidas en la integrasa son suficientes para romper la función normal. Se han construido y caracterizado muchas mutaciones de la integrasa (véase, Philpott y Thrasher, Human Gene Therapy 18: 483, 2.007; Apollonia, Thesis submitted to University College London, Abril 2.009, págs. 82-97; Engelman et al. J Virol 69: 2.729, 1.995; Nightingale et al. Mol Therapy, 13: 1.121, 2.006). La secuencia que codifica la proteína integrasa puede ser suprimida o mutada para hacer la proteína inactiva, preferiblemente sin debilitar de manera significativa la actividad de la transcriptasa inversa o la fijación como objetivo nuclear, evitándose de ese modo sólo la integración del provirus en el genoma de la célula diana. Las mutaciones aceptables pueden reducir la catálisis de la integrasa, transferencia de cadenas, unión a sitios *att*, unión a un ADN cromosómico huésped y otras funciones. Por ejemplo, una sola sustitución de ácido aspártico a asparagina en el resto 35 de integrasa de VIH o SIV suprime completamente la integración de ADN vírico. Las supresiones de la integrasa estarán confinadas en general al dominio C-terminal. La supresión de secuencia codificadora para los restos 235-288 da como resultado una integrasa no funcional útil (Engelman et al. J Virol 69: 2.729, 1.995). Como ejemplos adicionales, se pueden generar mutaciones, por ejemplo, Asp64 (se proporcionan los números de los restos para VIH-1, se pueden determinar fácilmente los números de los restos correspondientes para la integrasa de otros lentivirus o retrovirus por un experto) (por ej., D64E, D64V), Asp116 (por ej., D116N), Asn120 (por ej., N120K), Glu152, Gln148 (por ej., Q148A), Lys156, Lys159, Trp235 (por ej., W235E), Lys264 (por ej., K264R), Lys266 (por ej., K266R), Lys273 (por ej., K273R). Se pueden construir otras mutaciones y ensayar para integración, expresión de transgenes y cualquier otro parámetro deseable. Los ensayos para estas funciones son conocidos. Se pueden generar mutaciones por cualquiera de una variedad de técnicas, incluyendo mutagénesis dirigida y síntesis química de secuencia de ácidos nucleicos. Se pueden realizar una mutación o puede ser presente más de una de estas mutaciones en la integrasa. Por ejemplo, una integrasa puede presentar mutaciones en dos aminoácidos, tres aminoácidos, cuatro aminoácidos, etc.

Alternativamente o en combinación con el uso del mutante o los mutantes de la integrasa, los sitios de adhesión (*att*) en U3 y U5 también pueden ser mutados. La integrasa se une a estos sitios y el dinucleótido 3'-terminal se escinde en los dos extremos del genoma del vector. Un dinucleótido CA está situado en el extremo 3' retraído; el CA es requerido para el proceso, mutación de la integración de los bloques de nucleótidos en el cromosoma huésped. La A del dinucleótido CA es el nucleótido más crítico para integración y las mutaciones en los dos extremos del genoma proporcionarán los mejores resultados (Brown et al J Virol 73: 9.011 (1.999). En una ejemplificación, el CA en cada extremo se cambia a TG. En otras ejemplificaciones, el CA en cada extremo se cambia a TG en un extremo y GT en el otro extremo. En otras ejemplificaciones, el CA en cada extremo se suprime; en otras ejemplificaciones, la A del CA es suprimido en cada extremo.

La integración también se puede inhibir por mutación o supresión de tramo de polipurina (PPT, por sus siglas en inglés) (patente internacional WO 2009/076524), situado de manera proximal a la LTR 3'. El PPT es una secuencia de polipurina de aproximadamente 15 nucleótidos que puede servir como un sitio de unión de cebador para la síntesis de ADN de cadena positiva. En este caso, las mutaciones o supresiones de PPT fijan como objetivo el proceso de transcripción inversa. Sin desear estar sujeto a un mecanismo, por mutación o supresión de PPT, la producción de ADN lineal se reduce radicalmente y esencialmente sólo se producen ciclos de ADN de LTR-1. La integración requiere un genoma del vector de ADN bcatenarío lineal y la integración se elimina esencialmente sin él. Como se indicó anteriormente, un PPT se puede hacer no funcional por mutación o por supresión. Típicamente, se suprime el PPT completo de aproximadamente 15 nt, aunque en algunas realizaciones, se pueden realizar supresiones más cortas de 14 nt, 13 nt, 12 nt, 11 nt, 10 nt, 9 nt, 8 nt, 7 nt, 6 nt, 5 nt, 4 nt, 3 nt y 2 nt. Cuando se realizan mutaciones, típicamente se realizan múltiples mutaciones, especialmente en la mitad 5' del PPT (McWilliams et al., J Virol 77: 11.150, 2.003), aunque las mutaciones sencillas y dobles en las primeras cuatro bases aún reducen la transcripción. Las mutaciones realizadas en el extremo 3' de PPT tienen en general un efecto más espectacular (Popozo y Levin J Virol 70: 5.288, 1.996).

Estas diferentes propuestas para hacer no integrante un genoma del vector se pueden usar de manera individual o en combinación. Usar más de una propuesta se puede usar para construir un vector de seguridad a través de mecanismos redundantes. Así, se pueden combinar mutaciones o supresiones de PPT con mutaciones o supresiones del sitio *att* o con mutaciones de la Integrasa o se pueden combinar mutaciones o supresiones de PPT con tanto mutaciones o supresiones del sitio *att* como de mutaciones de la Integrasa. De manera similar, las mutaciones o supresiones del sitio *att* y las mutaciones de la Integrasa se pueden combinar entre sí o con mutaciones o supresiones de PPT.

2. Elementos reguladores

Como se discute en la presente memoria, el genoma vírico del vector comprende una secuencia de interés que es

deseable expresar en células diana. Típicamente, la secuencia de interés está situada entre las secuencias LTR 5' y LTR 3'. Además, la secuencia de interés está preferiblemente en una relación funcional con otros elementos genéticos, por ejemplo las secuencias reguladoras de la transcripción incluyendo activadores o potenciadores, para regular la expresión de la secuencia de interés de un modo particular. En algunos casos, las secuencias útiles reguladoras de la transcripción son aquellas que están muy reguladas con respecto a la actividad, tanto de manera temporal como espacial. Los elementos de control de la expresión que se pueden usar para regular la expresión de los componentes son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, activadores inducibles, activadores constitutivos, señales de secreción, potenciadores y otros elementos reguladores.

La secuencia de interés y cualquier otra secuencia que se pueda expresar están típicamente en una relación funcional con secuencias reguladoras de activador/potenciador internas. Un activador/potenciador "interno" es uno que está situado entre las secuencias LTR 5' y las LTR 3' en la construcción del vector vírico y está unido de manera operable a la secuencia de interés. El activador/potenciador interno puede ser cualquier activador, potenciador o combinación de activador/potenciador conocida para aumentar la expresión de un gen con que está en una relación funcional. Una "relación funcional" y "unido de manera operable" significan, sin limitación, que la secuencia está en la posición y orientación correcta con respecto al activador y/o potenciador en que se expresará la secuencia de interés cuando el activador y/o potenciador esté en contacto con las moléculas apropiadas.

La elección de un activador/potenciador interno se basa en el patrón de expresión deseado de la secuencia de interés y las propiedades específicas de activadores /potenciadores conocidos. Así, el activador interno puede ser activo de manera constitutiva. Ejemplos no limitantes de activadores constitutivos que se pueden usar incluyen el activador para ubiquitina (patente de EE.UU. 5510474; patente internacional WO 98/32869), CMV (Thomsen et al., PNAS 81: 659, 1.984; patente de EE.UU. 5168062), beta-actina (Gunning et al. 1.989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4.831 -4.835) y pgk (véase, por ejemplo, Adra et al. 1.987 Gene 60: 65-74; Singer-Sam et al. 1.984 Gene 32: 409-417 y Dobson et al. 1.982 Nucleic Acids Res. 10: 2.635-2.637).

Alternativamente, el activador puede ser un activador específico del tejido. En algunas realizaciones preferidas, el activador es un activador específico de células diana. Por ejemplo, el activador puede ser de cualquier producto expresado por células dendríticas, incluyendo CD11c, CD103, las TLR, CD-SIGN, BDCA-3, DEC-205, DCIR2, receptor de manosa, Dectin-1, Clec9A, CPH clase II. Además, los activadores se pueden seleccionar para que permitan la expresión inducible de la secuencia de interés. Se conoce una serie de sistemas para expresión inducible en la técnica, incluyendo el sistema sensible a la tetraciclina, el sistema represor del operador lac, así como los activadores sensibles a una variedad de cambios medioambientales o fisiológicos, incluyendo choque térmico, iones metálicos, tales como activador de metalotioneína, interferones, hipoxia, esteroides, tales como activador de receptores de progesterona o glucocorticoides, radiación, tal como activador de VEGF. También se puede usar una combinación de activadores para obtener la expresión deseada del gen de interés. El experto en la materia podrá seleccionar un activador basándose en el patrón de expresión deseado del gen en el organismo o la célula diana de interés.

El genoma vírico puede comprender al menos un activador sensible a la ARN Polimerasa II o III. Este activador puede estar unido de manera operable a la secuencia de interés y también puede estar unido a una secuencia de terminación. Además, se puede incorporar más de un activador de la ARN Polimerasa II o III. Los activadores de la ARN Polimerasa II o III son conocidos para un experto en la materia. Se puede encontrar un intervalo adecuado de activadores de la ARN polimerasa III, por ejemplo, en Paule and White, Nucleic Acids Research., Vol. 28, págs. 1.283-1.298 (2.000). Los activadores de la ARN polimerasa II o III también incluyen cualquier fragmento de ADN sintético o logrado que pueda dirigir la ARN polimerasa II o III para transcribir aguas abajo Secuencias codificadoras de ARN. Además, el activador o los activadores de la ARN polimerasa II o III (Pol II o III) usados como parte del genoma del vector vírico pueden ser inducibles. Cualquier activador de Pol II o III inducible adecuado se puede usar con los métodos de la invención. Los activadores de Pol II o III particularmente adecuados incluyen los activadores sensibles a tetraciclina proporcionados en Ohkawa y Taira, Human Gene Therapy, Vol. 11, págs. 577-585 (2.000) y en Meissner et al. Nucleic Acids Research, Vol. 29, págs. 1.672-1.682 (2.001).

También puede ser presente un potenciador interno en la construcción vírica para aumentar la expresión del gen de interés. Por ejemplo, se puede usar el potenciador de CMV (Boshart et al. Cell, 41: 521, 1.985). Se han identificado y caracterizado muchos potenciadores en genomas víricos, tales como VIH, CMV y en genomas de mamíferos (véase GenBank). Un potenciador se puede usar en asociación con un activador heterólogo. Un experto en la materia podrá seleccionar el potenciador apropiado basándose en el patrón de expresión deseado.

Un genoma del vector vírico contendrá normalmente un activador que es reconocido por la célula diana y que está unido de manera operable a la secuencia de interés, componentes víricos y otras secuencias como se discute en la presente memoria. Un activador es un elemento de control de expresión formado por una secuencia de ácidos nucleicos que permita la unión de la ARN polimerasa y que tenga lugar transcripción. Los activadores pueden ser inducibles, constitutivos, activos de manera temporal o específicos del tejido. La actividad de los activadores inducibles se induce por la presencia o ausencia de factores bióticos o abióticos. Los activadores inducibles pueden ser una herramienta útil en ingeniería genética debido a que la expresión de los genes a que están unidos de manera operable se puede activar o desactivar en ciertas fases del desarrollo de un organismo, su fabricación o en un tejido particular. Los activadores inducibles se pueden agrupar como activadores regulados de manera química y

activadores regulados de manera física. Los activadores regulados de manera química típicos incluyen, pero no se limitan a, activadores regulados por alcohol (por ej., activador del gen de alcohol deshidrogenasa I (alcA)), activadores regulados por la tetraciclina (por ej., activador sensible a la tetraciclina), activador regulado por los esteroides (por ej., activador a base de receptor de glucocorticoides de rata (GR, por sus siglas en inglés), activador a base de receptor de estrógenos humanos (ER, por sus siglas en inglés), activador a base de receptor de ecdisona de polilla y los activadores basados en la superfamilia de receptores de esteroides/retinoides/tiroides), activadores regulados por metales (por ej., activadores a base de gen de metalotioneína) y activadores relacionados con la patogénesis (por ej., activadores a base de proteínas relacionados con patógenos (PR, por sus siglas en inglés) *Arabidopsis* y del maíz). Los activadores regulados de manera física típicos incluyen, pero no se limitan a, activadores regulados por la temperatura (por ej., activadores de choque térmico) y activadores regulados por la luz (por ej., activador de SSU de la soja). Otros activadores ejemplares se describen en otra parte, por ejemplo, en "Promoters used to regulate gene expression" en el sitio web Patent Lens, accedido el 18 de mayo de 2.009.

Un experto en la materia podrá seleccionar un activador apropiado basándose en las circunstancias específicas. Muchos diferentes activadores son conocidos en la técnica, ya que son métodos para unir de manera operable el activador al gen que se tiene que expresar. Se pueden usar tanto secuencias activadoras naturales como muchos activadores heterólogos para dirigir la expresión en la célula de empaquetamiento y célula diana. Se prefieren activadores heterólogos, sin embargo, ya que permiten en general mayor transcripción y mayores rendimientos de la proteína deseada cuando se compara con el activador natural.

Se puede obtener el activador, por ejemplo, de los genomas de virus tales como virus polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus, virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y Virus 40 del Simio (SV40). El activador también puede ser, por ejemplo, un activador de mamíferos heterólogo, por ej., el activador de actina o un activador de inmunoglobulina, un activador de choque térmico o el activador normalmente asociado a la secuencia natural, siempre que dichos activadores sean compatibles con la célula diana. En una realización, el activador es el activador vírico que se encuentra en la naturaleza en un sistema de expresión vírica. En algunas realizaciones, el activador es un activador específico de células dendríticas. El activador específico de células dendríticas puede ser, por ejemplo, activador CD11c.

La transcripción se puede aumentar insertando una secuencia potenciadora en el vector o los vectores. Los potenciadores son típicamente elementos que actúan en cis de ADN, normalmente aproximadamente 10 a 300 pb de longitud, que actúan sobre un activador para aumentar su transcripción. Muchos secuencias potenciadoras son ahora conocidas de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e insulina) y de virus de células eucariotas. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el último lado del origen de la replicación (bp 100-270), el potenciador de activador temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el último lado del origen de la replicación y potenciadores de adenovirus. El potenciador puede ser empalmado al vector en una posición 5' o 3' a la secuencia de polinucleótido específica de antígeno, pero se sitúa preferiblemente en un sitio 5' del activador.

Los vectores de expresión también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Estas secuencias se encuentran con frecuencia en la 5' y ocasionalmente 3', regiones no traducidas de ADN o ADNc de eucariotas o víricos y son conocidos en la técnica.

El genoma vírico del vector también puede contener elementos genéticos adicionales. Los tipos de elementos que se pueden incluir en la construcción no están limitados de ninguna manera y se pueden elegir para conseguir un resultado particular. Por ejemplo, se puede incluir una señal que facilite la entrada nuclear del genoma vírico en la célula diana. Un ejemplo de dicha señal es la señal de la solapa del VIH-1. Además, se pueden incluir elementos que faciliten la caracterización del sitio de integración de provirus en la célula diana. Por ejemplo, se puede incluir una secuencia supresora ámbar de ARNt en la construcción. Una secuencia aisladora de por ej., también se puede incluir β -globina de pollo en la construcción de genoma vírico. Este elemento reduce la posibilidad de silenciar un provirus integrado en la célula diana debido a efectos de metilación y heterocromatinización. Además, el aislante puede proteger el potenciador interno, activador y gen exógeno de efectos de posición positivos o negativos de ADN circundante al sitio de integración en el cromosoma. Además, el genoma del vector puede contener uno o más elementos genéticos diseñados para activar la expresión del gen de interés. Por ejemplo, se puede reemplazar un elemento sensible al virus de la hepatitis de la marmota (WRE, por sus siglas en inglés) en la construcción (Zufferey et al. 1.999. J. Virol. 74: 3.668-3.681; Deglon et al. 2.000. Hum. Gene Ther. 11: 179-190).

El genoma vírico del vector se construye típicamente en una forma de plásmido que se puede transfectar en una estirpe celular de empaquetamiento o productora. El plásmido comprende en general secuencias útiles para la replicación del plásmido en las bacterias. Dichos plásmidos son conocidos en la técnica. Además, los vectores que incluyen un origen procariota de replicación también pueden incluir un gen cuya expresión confiera un marcador detectable o seleccionable tal como una resistencia a los fármacos. Los productos con resistencia a los fármacos bacterianos típicos son los que confieren resistencia a la ampicilina o tetraciclina.

Los plásmidos que contienen uno o más de los componentes descritos en la presente memoria son fácilmente contruidos usando técnicas clásicas conocidas en la técnica. Para análisis para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos contruidos, se puede replicar el plásmido en *E. coli*, purificar y analizar por digestión de

endonucleasa de restricción o determinar su secuencia de ADN por métodos convencionales.

También se pueden usar vectores construidos para expresión transitoria en células de mamífero. La expresión transitoria implica el uso de un vector de expresión que es capaz de replicación de manera eficaz en una célula huésped, de manera que la célula huésped acumula muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetiza altos niveles del polipéptido codificado por el polinucleótido específico del antígeno en el vector de expresión. Véase Sambrook et al., supra, págs. 16.17-16.22. Otros vectores y métodos adecuados para adaptación a la expresión de los polipéptidos son conocidos en la técnica y se adaptan fácilmente a las circunstancias específicas.

Usando las explicaciones proporcionadas en la presente memoria, un experto en la materia reconocerá que la eficacia de un sistema de expresión particular se puede ensayar por transfección de células de empaquetamiento con un vector que comprende un gen que codifica una proteína informadora y midiendo la expresión usando una técnica adecuada, por ejemplo, midiendo la fluorescencia de un conjugado de proteína fluorescente verde. Son conocidos los genes informadores adecuados en la técnica.

3. Tipos de secuencias de interés.

La secuencia de interés no está limitada de ninguna manera e incluye cualquier ácido nucleico que un experto desee integrar, transcribir y expresar en la célula diana. El producto puede ser una proteína o un ácido nucleico. La secuencia de interés puede codificar una proteína o una molécula de ácido nucleico, incluyendo ARNsi, ARNmico, un ARN bicatenario auto-complementario en que la región complementaria es mayor que aproximadamente 20 ribonucleótidos de longitud o un ARN que es complementario a un ARN mensajero, donde la unión de dicho ARN complementario (anti-sentido) al ARN mensajero bloquea su capacidad para que se traduzca en proteína. En algunos casos, la secuencia de interés puede codificar un antígeno contra el que se desea una respuesta inmunitaria. En particular, son deseables antígenos tumorales y antígenos de enfermedades infecciosas de los agentes tales como VIH, SHV, HCV, HPV, malaria o tuberculosis.

En algunos casos, la secuencia de interés puede ser un gen que codifique un ARN inhibidor pequeño (ARNsi) o un ARNmico (ARNmi) de interés que consigue aminorar la expresión de una molécula. Por ejemplo, el gen que codifican un ARNsi o un ARNmico se puede usar para conseguir aminorar la expresión de reguladores negativos en una célula, incluyendo los que inhiben la activación o maduración de células dendríticas. Los ARNsi y los ARNmico son conocidos en la técnica (Fire et al., Nature 391: 806, 1.998; véase también "The RNA Interference Resource" de Applied Biosystems, Trang et al. Oncogene Suppl 2: S52, 2.008; Taganov, K., et al. 2.007. Immunity 26: 133-137; Dahlberg, J. E. y E. Lund. 2.007. Sci. STKE 387: pe25; Tiemann and Rossi, EMBO Mol Med 1: 142, 2.009). Alternativamente, la secuencia de interés puede codificar un ARN bicatenario auto-complementario en que la región complementaria es mayor que aproximadamente 20 ribonucleótidos de longitud o un ARN anti-sentido que es mayor que aproximadamente 20 ribonucleótidos de longitud. Los expertos en la materia apreciarán que las moléculas ARNsi, ARNmi, ARNds y ARN anti-sentido se pueden expresar de un activador de la ARN polimerasa III o, alternativamente, puede ser un componente de un ARN no codificador que se transcribe de un activador de la ARN polimerasa II.

Además, la secuencia de interés puede codificar más de un producto. En algunas configuraciones, la secuencia que se tiene que suministrar comprende múltiples genes que codifican al menos una proteína, al menos una molécula ARNsi, al menos una ARNmico, al menos una ARNds o al menos una ARN anti-sentido o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, la secuencia que se tiene que suministrar puede incluir uno o más genes que codifiquen uno o más antígenos contra los que se desea una respuesta inmunitaria. El antígeno o más antígenos se pueden asociar a una sola enfermedad o trastorno o se pueden asociar a múltiples enfermedades y/o trastornos. En algunos casos, se puede incluir un gen que codifique una proteína reguladora inmunitaria junto con un gen que codifique un antígeno contra el que se desea una respuesta inmunitaria y la combinación puede provocar y regular la respuesta inmunitaria en la dirección y magnitud deseadas. En otros casos, se puede construir una secuencia que codifica una molécula de ARNsi, ARNmico, ARNds o ARN anti-sentido con un gen que codifique un antígeno contra el que se desea una respuesta inmunitaria y la combinación puede regular el alcance de la respuesta inmunitaria. Los productos se pueden producir como un producto de fusión inicial en que la secuencia codificadora está en relación funcional con un activador. Alternativamente, los productos se pueden codificar por separado y cada secuencia codificadora en relación funcional con un activador. Los activadores pueden ser iguales o diferentes.

En algunas configuraciones, los vectores contienen secuencias de polinucleótidos que codifican factores de maduración/estimuladores de células dendríticas. Las moléculas estimuladoras ejemplares incluyen GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-15, IL-21, IL-23, TNF α , B7.1, B7.2, 4-1BB, ligando CD40 (CD40L), CD40 inducible por fármacos (iCD40) y similares. Estos polinucleótidos están típicamente bajo el control de uno o más elementos reguladores que dirijan la expresión de las secuencias codificadoras en células dendríticas. La maduración de células dendríticas contribuye a vacunación exitosa (Banchereau, J y Palucka, A. K. Nat. Rev. Immunol. 5: 296-306 (2.005); Schuler, G. et al. Curr. Opin. Immunol. 15: 138-147 (2.003); Figdor, C. G. et al. Nat. Med. 10: 475-480 (2.004)). La maduración puede transformar las CD de células implicadas de manera activa en captura de antígenos en células especializadas para cebado de células T. Por ejemplo, el acoplamiento de CD40 por CD40L sobre células T colaboradoras con CD4 es una señal crítica para maduración de CD, dando como resultado una potente activación de células T CD8. Dichas moléculas estimuladoras se refieren también como factores de maduración o factores estimuladores de maduración.

Los puntos de control inmunitarios representan barreras significativas a la activación de inmunidad celular funcional en cáncer y anticuerpos antagonistas específicos para ligandos inhibidores en células T incluyendo CTLA4 y muerte programada-1 (PD-1) son ejemplos de agentes diana que se están evaluando en las clínicas. Un mecanismo de tolerancia significativo en infecciones crónicas y cáncer es el agotamiento funcional de las células T específicas de Ag que expresan altos niveles de PD-1. Como se ha demostrado que la potencia de inmunización terapéutica está significativamente mejorada por combinación con control de los puntos de control inmunitarios, como un ejemplo no limitante, se puede apreciar por los expertos en la materia que una propuesta alternativa para inhibir el punto de control inmunitario es inhibir la expresión de los ligandos de muerte (PD) programada uno y dos (PD-L1/L2). Una manera de conseguir la inhibición es por la expresión de moléculas de ARN tales como las descritas en la presente memoria, que reprimen la expresión de PD-L1/L2 en las CD transducidas con el vector lentivírico que codifica una o más de las moléculas de ARN. La maduración de las CD o la expresión de elementos particulares tales como puntos de control inmunitarios, por ejemplo ligandos PD-1, se puede caracterizar por análisis de citometría de flujo de regulación ascendente de marcador superficial tal como CPH II y el perfil de quimiocinas y citocinas expresadas.

Se puede incluir una secuencia que codifica un producto detectable, normalmente una proteína, para permitir la identificación de células que expresan el producto deseado. Por ejemplo, se incorpora una proteína de marcador fluorescente, tal como proteína fluorescente verde (GFP), a la construcción junto con una secuencia de interés (por ej., que codifique un antígeno). En otros casos, la proteína puede ser detectable por un anticuerpo o la proteína puede ser una enzima que actúe sobre un sustrato para proporcionar un producto detectable o un producto que permita la selección de una célula diana transfectada o transducida, por ejemplo confiera resistencia a los fármacos, tal como resistencia a la higromicina. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas adecuadas para uso en células eucariotas, por ej., neomicina, metotrexato, blasticidina, entre otros conocidos en la técnica o deficiencias auxotróficas complemento o suministro de nutrientes críticos retenidos del medio. El marcador seleccionable puede estar presente opcionalmente en un plásmido separado e introducido por co-transfección.

Se puede utilizar una o más unidades de expresión multicistónicas que incluyan dos o más de los elementos (por ej., secuencia(s) de interés, la molécula de envoltura, factores de maduración de CD) necesarios para la producción del virus deseado en células de empaquetamiento. El uso de vectores multicistónicos reduce el número total de moléculas de ácido nucleico requeridas y así evita las posibles dificultades asociadas a la coordinación de la expresión de múltiples genoma de vectores. En un vector multicistónico los diversos elementos que se tienen que expresar se unen de manera operable a uno o más activadores (y otros elementos de control de la expresión cuando sea necesario). En algunas configuraciones, un vector multicistónico comprende una secuencia de interés, una secuencia que codifica un producto informador y elementos víricos. La secuencia de interés codifica típicamente un antígeno y opcionalmente, un factor de maduración de CD. A veces, el vector multicistónico comprende un gen que codifica un antígeno, un gen que codifica un factor de maduración de CD y elementos víricos.

Cada componente que se tenga que expresar en un vector multicistónico de expresión se puede separar, por ejemplo, por un elemento del sitio interno de entrada en el ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés) o un elemento vírico 2A, para permitir separar la expresión de las diversas proteínas del mismo activador. Los elementos de IRES y los elementos 2A son conocidos en la técnica (Patente de EE.UU. N° 4.937.190; de Felipe et al. 2.004. Traffic 5: 616-626). En una realización, los oligonucleótidos que codifican las secuencias del sitio de escisión de furina (RAKR) (Fang et al. 2.005. Nat. Biotech 23: 584-590, unidos a las secuencias de tipo 2A de virus de la enfermedad de pies y boca (FMDV, por sus siglas en inglés), virus de la rinitis equina A (ERAV, por sus siglas en inglés) y virus del asno de thosa (TaV, por sus siglas en inglés) (Szymczak et al. 2.004. Nat. Biotechnol. 22: 589-594) son usados para separar elementos genéticos en un vector multicistónico. La eficacia de un vector multicistónico particular se puede ensayar fácilmente por detección de la expresión de cada uno de los genes usando protocolos clásicos.

En una ejemplificación específica, el genoma vírico del vector comprende: una secuencia potenciador /activador de citomegalovirus (CMV); las secuencias R y U5 de la LTR 5' de VIH; una secuencia de empaquetamiento (ψ); la señal de la solapa de VIH-1; un potenciador interno; un activador interno; un gen de interés; el elemento responsable del virus de la hepatitis de la marmota; una secuencia supresora ámbra de ARNt; un elemento U3 con una supresión de su secuencia potenciadora; el aislante de β -globina de pollo y las secuencias R y U5 de la LTR 3' del VIH. En algunas ejemplificaciones, el genoma del vector comprende una LTR 5' lentivírica intacta y una LTR 3' auto-inactivante. (Iwakuma et al. Virology 15: 120, 1.999).

La construcción del genoma del vector se puede llevar a cabo usando cualquier técnica de ingeniería genética adecuada conocida en la técnica, incluyendo, sin limitación, las técnicas clásicas de digestión de endonucleasa de restricción, ligadura, transformación, purificación de plásmido y secuenciación de ADN, por ejemplo como se describe en Sambrook et al. (1.989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.), Coffin et al. (Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. (1.997)) y "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed. Oxford University Press, (2.000)).

4. Producción de partículas víricas.

Se puede usar cualquiera de una variedad de métodos ya conocidos en la técnica para producir partículas lentivíricas infecciosas cuyo genoma comprende una copia de ARN del genoma vírico del vector. En un método, el

genoma vírico del vector es introducido en una estirpe celular de empaquetamiento que contiene todos los componentes necesarios para empaquetar ARN genómico vírico, transcrito del genoma de vector vírico, en partículas víricas. Alternativamente, el genoma vírico del vector puede comprender uno o más genes codificadores de componentes víricos además de una o más secuencias de interés. Para prevenir la replicación del genoma en la célula diana, sin embargo, se retirarán normalmente los genes víricos endógenos requeridos para la replicación y se proporcionarán por separado en la estirpe celular de empaquetamiento.

En general, las partículas de vector lentivírico se producen por una estirpe celular que se transfecta con uno o más vectores plásmidos que contienen los componentes necesarios para generar las partículas. Estas partículas de vector lentivírico no son típicamente competentes para la replicación, es decir, son sólo capaces de una sola vuelta de infección. Lo más frecuentemente, se utilizan múltiples vectores plásmidos para separar los diversos componentes genéticos que generan las partículas de vector lentivírico, principalmente para reducir la posibilidad de procesos de recombinación que podían de otro modo generar replicación de virus competentes. Se puede usar un solo vector de plásmido con los componentes lentivíricos si se desea, sin embargo. Como un ejemplo de un sistema que emplea múltiples vectores de plásmidos, se transfecta una estirpe celular con al menos un plásmido que contiene el genoma vírico del vector (es decir, el plásmido del genoma del vector), incluyendo las LTR, la secuencia de empaquetamiento que actúa en cis y la secuencia o las secuencias de interés, que con frecuencia se unen de manera operable a un activador heterólogo, al menos un plásmido que codifica los componentes enzimáticos y estructurales del virus (es decir, el plásmido de empaquetamiento que codifica componentes tales como, Gag y Pol), y al menos un plásmido de envoltura que codifica una glucoproteína de envoltura de Arbovirus. Se pueden usar plásmidos adicionales para mejorar la producción de partículas de retrovirus, por ej., plásmidos de expresión de Rev, como se describe en la presente memoria y se conoce en la técnica. Las partículas víricas brotan a través de la membrana celular y comprenden un núcleo que incluye un genoma que contiene la secuencia de interés y una glucoproteína de envoltura de Arbovirus que fija como objetivo células dendríticas. Cuando la glucoproteína de Arbovirus es glucoproteína E2 de virus Sindbis, se logra que la glucoproteína presente unión reducida a sulfato de heparán comparado con la cepa de HR de referencia.

La transinfección de células de empaquetamiento con vectores plásmidos de la presente invención se puede llevar a cabo por métodos conocidos y el método que se tiene que usar no está limitado de ningún modo. Se conoce una serie de sistemas de suministro no víricos en la técnica, incluyendo por ejemplo, electroporación, sistemas de suministro a base de lípidos incluyendo liposomas, suministro de ADN "desnudo" y suministro usando compuestos de policiclodextrina, tales como los descritos en Schatzlein AG. (2.001. Non-Viral Vectors in Cancer Gene Therapy: Principles and Progresses. Anticancer Drugs, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad). Se emplean típicamente métodos de tratamiento de lípidos o sales catiónicos, véase, por ejemplo, Graham et al. (1.973. Virol. 52: 456; Wigler et al. (1.979. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1.373-76)). El método de precipitación de fosfato de calcio es lo más usado con frecuencia. Sin embargo, también se pueden usar otros métodos para introducir el vector en células, incluyendo microinyección nuclear y fusión de protoplastos bacterianos.

La estirpe celular de empaquetamiento proporciona los componentes, incluyendo proteínas reguladoras y estructurales víricas, que son requeridas en *trans* para el empaquetamiento del ARN genómico vírico en partículas del vector lentivírico. La estirpe celular de empaquetamiento puede ser cualquier estirpe celular que sea capaz de expresar proteínas lentivíricas y producir partículas del vector lentivírico funcionales. Algunas estirpes celulares de empaquetamiento adecuadas incluyen células 293 (ATCC CCL X), 293T, HeLa (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) y Cf2Th (ATCC CRL 1430). La estirpe celular de empaquetamiento puede expresar de manera estable las proteínas víricas necesarias. Dicha estirpe celular de empaquetamiento se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N° 6.218.181. Alternativamente, se puede transfectar de manera transitoria una estirpe celular de empaquetamiento con moléculas de ácido nucleico que codifiquen una o más proteínas víricas necesarias junto con el genoma del vector vírico. Las partículas víricas resultantes se recogieron y se usaron para infectar una célula diana. El gen o los genes que codifican la glucoproteína o las glucoproteínas de envoltura se clonan normalmente en un vector de expresión, tal como pcDNA3 (Invitrogen, CA USA). Los vectores de expresión de células eucariotas son conocidos en la técnica y están disponibles en una serie de fuentes comerciales. Las células de empaquetamiento, tales como las células 293T se co-transfectan después con el genoma vírico del vector que codifica una secuencia de interés (típicamente que codifica un antígeno), al menos un plásmido que codifica componentes de empaquetamiento de virus y un vector para la expresión de la molécula diana. La envoltura se expresa sobre la membrana de la célula de empaquetamiento y se incorpora al vector vírico.

En un caso hipotético, se usa uno o más vectores para introducir secuencias de polinucleótidos en una estirpe celular de empaquetamiento para la preparación de una partícula de vector lentivírico pseudotipificado con una glucoproteína de envoltura de virus Sindbis tal como E2, como se describe en la presente memoria. Los vectores pueden contener secuencias de polinucleótidos que codifican los diversos componentes del virus incluyendo la envoltura del virus Sindbis, una secuencia o secuencias de interés (que codifican típicamente un antígeno) y cualquier componente necesario para la producción del virus que no se proporcione por la célula de empaquetamiento.

En otros casos hipotéticos más, las células de empaquetamiento se co-transfectan con un genoma del vector vírico que codifica un antígeno y uno o más vectores adicionales. Por ejemplo, además del vector vírico que codifica un

antígeno, un segundo vector soporta preferiblemente los genes que codifican una envoltura de virus Sindbis modificada (también denominado una variante). En algunas situaciones, el genoma vírico del vector que codifica un antígeno también incluye una secuencia de polinucleótidos que codifica un factor de modulación inmunitaria seleccionado, incluyendo ejemplos no limitantes de una quimiocina, una citocina, un factor de maduración de CD o un factor que regula los mecanismos de los puntos de control inmunitarios. En otras situaciones, la secuencia de polinucleótidos que codifica un factor de modulación inmunitaria seleccionado está contenida en un tercer vector que se co-transfecta con el vector vírico que codifica un antígeno y uno o más vectores adicionales en las células de empaquetamiento.

La producción de virus se mide como se describe en la presente memoria y se expresa como UI por volumen. UI es unidad infecciosa o alternativamente unidades de transducción (UT); UI y UT se pueden usar indistintamente como una medida cuantitativa del título de una preparación de partículas de vector vírico. Como se describe en la presente memoria, el virus se produce en el que el genoma puede expresar un producto que es fácilmente medible. Se prefiere una proteína fluorescente, proteína fluorescente verde. El vector lentivírico es típicamente de no integración. El virus se administra después a células diana y se determina el número de células diana que expresa GFP, tal como por citometría de flujo (véase el Ejemplo 3). Se calcula después el título. El título es preferiblemente tan alto como sea posible, pero al menos 1×10^5 UI / ml, al menos 3×10^5 UI / ml, al menos 1×10^6 UI / ml, al menos 3×10^6 UI / ml o al menos 1×10^7 UI / ml de sobrenadante de células (antes de cualquier concentración). Alternativamente, el título es al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100% del título del mismo vector lentivírico pseudotipificado en las mismas células con envoltura VSV-G.

C. Suministro del Virus.

El virus se puede suministrar a una célula diana de cualquier manera que permita que el virus se ponga en contacto con las células dendríticas diana (las CD) en que se desea el suministro de un polinucleótido de interés. A veces, se introducirá una cantidad adecuada de virus en un ser humano u otro animal directamente (in vivo), por ej., por inyección en el cuerpo. Los animales adecuados incluyen, sin limitación, caballos, perros, gatos, ganado vacuno, cerdos, ovejas, conejos, pollos u otras aves. Las partículas víricas se pueden inyectar por una serie de vías, tales como cavidad intravenosa, intradérmica, subcutánea, intranodal, intra-peritoneal o mucosal. El virus se puede suministrar usando un dispositivo de inyección subdérmica tal como los dispositivos desvelados en las Patentes de EE.UU. Nos. 7.241.275, 7.115.108, 7.108.679, 7.083.599, 7.083.592, 7.047.070, 6.971.999, 6.808.506, 6.780.171, 6.776.776, 6.689.118, 6.670.349, 6.569.143, 6.494.865, 5.997.501, 5.848.991, 5.328.483, 5.279.552, 4.886.499. Otras locaciones de inyección también son adecuadas, tales como directamente en órganos que comprenden células diana. Por ejemplo, se puede usar inyección intra-ganglio linfático, inyección intra-bazo o inyección intra-médula ósea para suministrar virus al ganglio linfático, el bazo y la médula ósea, respectivamente. Dependiendo de las circunstancias particulares y la naturaleza de las células diana, la introducción se puede realizar a través de otros medios incluyendo por ejemplo, inhalación o contacto directo con tejidos epiteliales, por ejemplo aquéllos en el ojo, la boca o la piel.

Alternativamente, se proporcionan células diana y se ponen en contacto con el virus in vitro, tal como en placas de cultivo. Las células diana son típicamente poblaciones de células que comprenden células dendríticas obtenidas de un individuo sano o un individuo con necesidad de tratamiento o en que se desea estimular una respuesta inmunitaria a un antígeno. Los métodos para obtener células de un individuo son conocidos en la técnica e incluyen flebotomía, escisión quirúrgica y biopsia. También se pueden generar las CD humanas por obtención de progenitores hematopoyéticos humanos CD34 α + y usando un método de cultivo in vitro como se describe en otra parte (por ej., Banchereau et al. Cell 106, 271-274 (2.001)).

El virus se puede suspender en medio y añadir a los pozos de una placa de cultivo, tubo u otro envase. Los medios que contienen el virus se pueden añadir previamente a cultivo directo en placas de las células o después de que se haya puesto en placas las células. Se incubaron las células típicamente en una cantidad apropiada de medio para proporcionar viabilidad y permitir concentraciones adecuadas de virus en el medio de manera que tenga lugar transducción de la célula huésped. Las células se incuban preferiblemente con el virus durante una cantidad de tiempo suficiente para permitir que el virus infecte las células. Preferiblemente, las células se incuban con virus durante al menos 1 hora, al menos 5 horas o al menos 10 horas.

En suministro tanto in vivo como in vitro, se puede usar una alícuota de partículas víricas que contenga suficiente número para infectar las células diana deseadas. Cuando se tiene que cultivar la célula diana, la concentración de las partículas víricas es en general al menos 1 UI/ μ l, más preferiblemente al menos 10 UI/ μ l, incluso más preferiblemente al menos 300 UI/ μ l, incluso más preferiblemente al menos 1×10^4 UI/ μ l, incluso más preferiblemente al menos 1×10^5 UI/ μ l, incluso más preferiblemente al menos 1×10^6 UI/ μ l o incluso más preferiblemente al menos 1×10^7 UI/ μ l.

Después de la infección con el virus in vitro, se pueden introducir células diana (o re-introducir) en un ser humano u otro animal. Las células pueden ser introducidas en la dermis, debajo de la dermis o en el torrente circulatorio periférico. Las células introducidas en un animal son preferiblemente células derivadas de ese animal, para evitar una respuesta inmunitaria adversa. También se pueden usar células derivadas de un donador con un antecedente inmunitario similar. Otras células que también se pueden usar incluyen las designadas para evitar una respuesta

inmunológica adversa.

Se pueden analizar células diana para integración, transcripción y/o expresión de la secuencia o el gen o los genes de interés, el número de copias del gen integrado y la posición de la integración, para ejemplos. Dicho análisis se puede realizar en cualquier momento y se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica.

- 5 En los individuos en que se administra un virus o células dendríticas infectadas por virus se puede analizar la posición de células infectadas, la expresión del polinucleótido suministrado por virus o gen de interés, estimulación de una respuesta inmunitaria y se controlaron los síntomas asociados a una enfermedad o trastorno por cualquier método conocido en la técnica.

- 10 Los métodos de infección de células desvelados anteriormente no dependen de las características específicas del individuo de las células. Como resultado, se extienden fácilmente a una variedad de especies animales. En algunos casos, se suministran partículas víricas a un ser humano o a células dendríticas humanas y en otros casos se suministran a un animal tal como un ratón, caballo, perro, gato o ratón o a aves. Como se discute en la presente memoria, el genoma vírico del vector es pseudotipificado para conferirle una amplia serie de huéspedes así como especificidad de células diana. Un experto en la materia también conocería activadores internos apropiados y otros elementos para conseguir la expresión deseada de una secuencia de interés en una especie animal particular. Así, un experto en la materia podrá modificar el método de infección de células dendríticas de cualquier especie.

D. Inmunizaciones terapéuticas y profilácticas.

- 20 Las células dendríticas pueden ser infectadas con una partícula de vector lentivírico como se describe en la presente memoria para la prevención de, o el tratamiento de, una enfermedad o un trastorno, en particular aquéllos para los que la activación de una respuesta inmunitaria en un paciente sería beneficiosa. Muchas de esas enfermedades son conocidas. Por ejemplo, las enfermedades o los trastornos que son susceptibles de tratamiento o prevención por los métodos de la presente invención incluyen, sin limitación, tumores malignos, enfermedades autoinmunitarias e infecciones, incluyendo infecciones víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias. En un método, una enfermedad se trata mediante partículas víricas descritas en la presente memoria para suministrar una secuencia de interés a células dendríticas, en la que la expresión de la secuencia de interés produce un antígeno específico de la enfermedad y conduce a estimulación de respuestas inmunitarias celulares específicas de antígeno y respuestas inmunitarias humores. En general, la secuencia de interés codifica un antígeno contra el que se desea una respuesta inmunitaria, pero no se expresa normalmente en una célula dendrítica. El antígeno se expresa y se presenta por la célula dendrítica. El genoma vírico del vector puede codificar además un factor de maduración de CD.

- 30 En un uso típico, las partículas víricas suministran a células dendríticas secuencias que codifican un antígeno contra el que se desea una respuesta inmunitaria. El suministro se puede conseguir poniendo en contacto células dendríticas con el virus in vitro, después de lo cual las células dendríticas infectadas son proporcionadas a un paciente. Otras veces, el suministro se puede conseguir suministrando el virus a un individuo para infectar células dendríticas in vivo. Las células dendríticas estimulan después células T o células B específicas de antígeno en un paciente para inducir respuestas inmunitarias celulares y humores al antígeno expresado. De tales formas, un paciente que padece una enfermedad o trastorno se trata por generación de células inmunitarias con una especificidad deseada.

- 40 Cualquier antígeno que esté asociado a una enfermedad o trastorno se puede suministrar a células dendríticas usando las partículas víricas como se describe en la presente memoria. Un antígeno que está asociado a la enfermedad o trastorno se identifica para la preparación de una partícula vírica que fije como objetivo células dendríticas. Los antígenos asociados a muchas enfermedades y trastornos son conocidos en la técnica. Se puede conocer previamente que un antígeno esté asociado a la enfermedad o trastorno o se puede identificar por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede conocer un antígeno para un tipo de cáncer que esté padeciendo un paciente, tal como un antígeno asociado al tumor o se puede identificar del propio tumor por cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica.

- 50 Son conocidos los antígenos asociados a tumores para una variedad de tumores malignos incluyendo, por ejemplo, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, melanoma y cáncer de mama. En algunos tumores malignos de mama, por ejemplo, el receptor de Her-2 se sobreexpresa en la superficie de células cancerosas. Los antígenos de tumores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, MAGE, BAGE, RAGE y NY-ESO-1, que son antígenos no mutados expresados en las áreas privilegiadas inmunitarias de los ensayos y en una variedad de células tumorales; antígenos de tumores específicos del linaje tales como antígenos del linaje de melanocitos-melanoma MART-1/Melan-A, gp100, gp75, mda-7, proteína tirosinasa y relacionada con la tirosinasa, carcinoma de células renales - 5T4, SM22-alfa, anhidrasas carbónicas I y IX (también conocidas como G250), factores inducibles por hipoxia (por ej., HIF-1 alfa y HIF-2alfa), VEGF o antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA, por sus siglas en inglés), antígeno específico de la próstata (PSA, por sus siglas en inglés), fosfatos ácidos prostáticos y antígeno epitelial de seis dominios transmembrana (STEAP, por sus siglas en inglés), NKX3.1, que son antígenos expresados en células normales y neoplásicas derivadas del mismo tejido; proteínas/péptidos de epítomos derivados de genes mutados en células tumorales o genes transcritos a diferentes niveles en el tumor comparado con células normales,

tales como enzima telomerasa, survivina, mesotelina, ras mutado, reorganización de bcr/abl, Her2/neu, p53 mutado o de cepa natural, citocromo P450 1B1 y secuencias de intrones expresadas anormalmente tales como N-acetilglucosaminiltransferasa-V; reordenaciones clónicas de genes de inmunoglobulina que generan idiotipos únicos en el mieloma y linfomas de células B; proteínas/péptidos de epítomos derivados de procedimientos oncovíricos, tales como proteínas del virus del papiloma humano E6 y E7; proteínas oncofetales no mutadas con una expresión selectiva del tumor, tal como antígeno carcinoembrionario y alfa-fetoproteína. Se ha revisado una serie de antígenos asociados al tumor (véase, por ejemplo, "Tumor-Antigens Recognized By T-Lymphocytes," Boon T, Cerottini J C, Vandeneuynde B, Vanderbruggen P, Vanpel A, Annual Review Of Immunology 12: 337-365, 1.994; "A listing of human tumor antigens recognized by T cells," Renkvist N, Castelli C, Robbins P F, Parmiani G. Cancer Immunology Immunotherapy 50: (1) 3-15 de marzo de 2.001).

El antígeno también puede ser un antígeno asociado a una enfermedad infecciosa, tal como, por ejemplo, VIH/SIDA. El antígeno puede ser, por ejemplo, gp120 (Klimstra, W. B. et al. 2.003. J Virol 77: 12.022-12.032; Bernard, K. A., et al. 2.000. Virology 276: 93-103; Byrnes, A. P., et al. 1.998. J Virol 72: 7.349-7.356). Otros antígenos ejemplares incluyen, pero no se limitan a: gag, pol, env, tat, nef y rev (Lieberman, J. et al. 1.997. AIDS Res Hum Retroviruses 13 (5): 383-392; Menendez-Arias, L. et al. 1.998. Viral Immunol 11 (4): 167-181).

Los ejemplos de antígenos víricos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de adenovirus, polipéptidos de alfavirus, polipéptidos de calicivirus, por ej., un antígeno de la cápside de calicivirus, polipéptidos de coronavirus, polipéptidos de virus del distemper, polipéptidos de virus de Ebola, polipéptidos de enterovirus, polipéptidos de flavivirus, polipéptidos de virus de la hepatitis (AE), por ej., un antígeno del núcleo o de superficie de la hepatitis B o una glucoproteína E1 o E2 del virus de la hepatitis C, proteínas de núcleo o no estructurales, polipéptidos de herpesvirus, por ej., una glucoproteína de virus de herpes simple o de virus de varicela zóster, polipéptidos de virus de inmunodeficiencia, por ej., la envoltura o proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana, polipéptidos de virus de peritonitis infecciosa, polipéptidos de virus de la influenza, por ej., una hemaglutinina de la influenza A, neuraminidasa o nucleoproteína, polipéptidos de virus de la leucemia, polipéptidos de virus de Marburg, polipéptidos de ortomixovirus, polipéptidos de virus de papiloma, polipéptidos de virus de parainfluenza, por ej., la hemaglutinina/neuraminidasa, polipéptidos de paramixovirus, polipéptidos de parvovirus, polipéptidos de pestivirus, polipéptidos de virus de picorna, por ej., un polipéptido de cápside de poliovirus, polipéptidos de pox virus, por ej., un polipéptido de virus vaccinia, polipéptidos del virus rabies, por ej., una glucoproteína G del virus rabies, polipéptidos de reovirus, polipéptidos de retrovirus y polipéptidos de rotavirus.

Los ejemplos de antígenos bacterianos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de Actinomyces, polipéptidos de Bacillus, polipéptidos de Bacteroides, polipéptidos de Bordetella, polipéptidos de Bartonella, polipéptidos de Borrelia, por ej., OspA de B. burgdorferi, polipéptidos de Brucella, polipéptidos de Campylobacter, polipéptidos de Capnocytophaga, polipéptidos de Chlamydia, polipéptidos de Clostridium, polipéptidos de Corynebacterium, polipéptidos de Coxiella, polipéptidos de Dermatophilus, polipéptidos de Enterococcus, polipéptidos de Ehrlichia, polipéptidos de Escherichia, polipéptidos de Francisella, polipéptidos de Fusobacterium, polipéptidos de Haemobartonella, polipéptidos de Haemophilus, por ej., proteína de la membrana externa de H. influenzae tipo b, polipéptidos de Helicobacter, polipéptidos de Klebsiella, polipéptidos de bacterias en forma de L, polipéptidos de Leptospira, polipéptidos de Listeria, polipéptidos de Mycobacteria, polipéptidos de Mycoplasma, polipéptidos de Neisseria, polipéptidos de Neorickettsia, polipéptidos de Nocardia, polipéptidos de Pasteurella, polipéptidos de Peptococcus, polipéptidos de Peptostreptococcus, polipéptidos de Pneumococcus, polipéptidos de Proteus, polipéptidos de Pseudomonas, polipéptidos de Rickettsia, polipéptidos de Rochalimaea, polipéptidos de Salmonella, polipéptidos de Shigella, polipéptidos de Staphylococcus, polipéptidos de Streptococcus, por ej., proteínas M de S. pyogenes, polipéptidos de Treponema y polipéptidos de Yersinia, por ej., antígenos de Y. pestis F1 y V.

Los ejemplos de antígenos fúngicos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de Absidia, polipéptidos de Acremonium, polipéptidos de Alternaria, polipéptidos de Aspergillus, polipéptidos de Basidiobolus, polipéptidos de Bipolaris, polipéptidos de Blastomyces, polipéptidos de Candida, polipéptidos de Coccidioides, polipéptidos de Conidiobolus, polipéptidos de Cryptococcus, polipéptidos de Curvalaria, polipéptidos de Epidermophyton, polipéptidos de Exophiala, polipéptidos de Geotrichum, polipéptidos de Histoplasma, polipéptidos de Madurella, polipéptidos de Malassezia, polipéptidos de Microsporum, polipéptidos de Moniliella, polipéptidos de Mortierella, polipéptidos de Mucor, polipéptidos de Paecilomyces, polipéptidos de Penicillium, polipéptidos de Phialemonium, polipéptidos de Phialophora, polipéptidos de Prototheca, polipéptidos de Pseudallescheria, polipéptidos de Pseudomicrodochium, polipéptidos de Pythium, polipéptidos de Rhinosporidium, polipéptidos de Rhizopus, polipéptidos de Scolecobasidium, polipéptidos de Sporothrix, polipéptidos de Stemphylium, polipéptidos de Trichophyton, polipéptidos de Trichosporon y polipéptidos de Xylohypha.

Los ejemplos de antígenos de parásitos protozoarios incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de Babesia, polipéptidos de Balantidium, polipéptidos de Besnoitia, polipéptidos de Cryptosporidium, polipéptidos de Eimeria, polipéptidos de Encephalitozoon, polipéptidos de Entamoeba, polipéptidos de Giardia, polipéptidos de Hammondia, polipéptidos de Hepatozoon, polipéptidos de Isospora, polipéptidos de Leishmania, polipéptidos de Microsporidia, polipéptidos de Neospora, polipéptidos de Nosema, polipéptidos de Pentatrichomonas, polipéptidos de Plasmodium, por ej., P. falciparum circumsporozoite (PfCSP), proteína 2 de superficie de sporozoite (PfSSP2), término carboxilo de antígeno 1 del estado del hígado (PfLSA1 c-term) y proteína 1 exportada (PfExp-1), polipéptidos de Pneumocystis, polipéptidos de Sarcocystis, polipéptidos de Schistosoma, polipéptidos de Theileria, polipéptidos de

Toxoplasma y polipéptidos de Trypanosoma.

Los ejemplos de antígenos de parásitos helmínticos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de Acanthocheilonema, polipéptidos de Aelurostrongylus, polipéptidos de Ancylostoma, polipéptidos de Angiostrongylus, polipéptidos de Ascaris, polipéptidos de Brugia, polipéptidos de Bunostomum, polipéptidos de Capillaria, polipéptidos de Chabertia, polipéptidos de Cooperia, polipéptidos de Crenosoma, polipéptidos de Dictyocaulus, polipéptidos de Dioctophyme, polipéptidos de Dipetalonema, polipéptidos de Diphylobothrium, polipéptidos de Diplydium, polipéptidos de Dirofilaria, polipéptidos de Dracunculus, polipéptidos de Enterobius, polipéptidos de Filaroides, polipéptidos de Haemonchus, polipéptidos de Lagochilascaris, polipéptidos de Loa, polipéptidos de Mansonella, polipéptidos de Muellerius, polipéptidos de Nanophyetus, polipéptidos de Necator, polipéptidos de Nematodirus, polipéptidos de Oesophagostomum, polipéptidos de Onchocerca, polipéptidos de Opisthorchis, polipéptidos de Ostertagia, polipéptidos de Parafilaria, polipéptidos de Paragonimus, polipéptidos de Parascaris, polipéptidos de Physaloptera, polipéptidos de Protostrongylus, polipéptidos de Setaria, polipéptidos de Spirocerca, polipéptidos de Spirometra, polipéptidos de Stephanofilaria, polipéptidos de Strongyloides, polipéptidos de Strongylus, polipéptidos de Thelazia, polipéptidos de Toxascaris, polipéptidos de Toxocara, polipéptidos de Trichinella, polipéptidos de Trichostrongylus, polipéptidos de Trichuris, polipéptidos de Uncinaria y polipéptidos de Wuchereria.

Los ejemplos de antígenos de ectoparásitos incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos (incluyendo antígenos protectores así como alérgenos) de pulgas; garrapatas, incluyendo garrapatas duras y garrapatas blandas; moscas, tales como quironómidos, mosquitos, moscas de la arena, simúlidos, tábanos, moscas de los cuernos, moscas del venado, moscas tsetsé, moscas de los establos, moscas causantes de miasis y mosquitos mordedores; hormigas; arañas, piojos; ácaros y chinches verdaderas, tales como chinches y chinches besuconas.

Una vez que se ha identificado y seleccionado un antígeno, se identifica una secuencia que codifica el antígeno deseado. Preferiblemente, la secuencia comprende un ADNc. Después de la infección vírica, la secuencia de interés (por ej., una que codifique el antígeno) se expresa por las células dendríticas diana. Si se ponen en contacto ex vivo, las células dendríticas diana se tienen que volver a transferir después al paciente, por ejemplo por inyección, donde interaccionan con células inmunitarias que sean capaces de generar una respuesta inmunitaria contra el antígeno deseado. En realizaciones preferidas, se inyecta el virus recombinante al paciente donde transduce las células dendríticas diana in situ. Las células dendríticas expresan entonces el antígeno particular asociado a una enfermedad o trastorno que se tiene que tratar y el paciente puede incrementar una respuesta inmunitaria eficaz contra la enfermedad o el trastorno.

El genoma vírico del vector puede contener una secuencia de polinucleótidos que codifique más de un antígeno y en la transducción de una célula dendrítica diana, genera respuestas inmunitarias a la multitud de antígenos suministrados a la célula. En algunas realizaciones, los antígenos se relacionan con una sola enfermedad o trastorno. En otras realizaciones, los antígenos se relacionan con múltiples enfermedades o trastornos.

En algunos de los virus, los factores de maduración de CD que activan y/o estimulan la maduración de las CD se suministran junto con la secuencia de interés. En alternativas, las CD se activan por suministro de factores de maduración de CD previamente a, de manera simultánea con o después de suministro del virus. Los factores de maduración de CD pueden ser proporcionados por separado de la administración del virus.

Como se describe en la presente memoria, uno o más factores de modulación inmunitaria o de maduración de CD pueden ser codificados por una o más secuencias que estén contenidas en el genoma vírico y se expresan después de que el virus infecta a la célula dendrítica. Las secuencias que codifican los factores de modulación inmunitarios también pueden ser proporcionadas en un vector separado que se co-transinfecta con el vector vírico que codifica uno o más antígenos en una estirpe celular de empaquetamiento.

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para inmunotratamiento adoptivo en un paciente. Como se describió anteriormente, se identifica un antígeno contra el que se desea una respuesta inmunitaria. Se obtiene un polinucleótido que codifica el antígeno deseado y se empaqueta en un virus recombinante. Se obtienen células dendríticas diana del paciente y se transducen con un virus recombinante que contiene un polinucleótido que codifica el antígeno deseado. Las células dendríticas se transfieren de nuevo después al paciente.

Las partículas víricas se pueden inyectar in vivo, donde infectan las CD y suministran una secuencia de interés, codificando típicamente un antígeno. La cantidad de partículas víricas es al menos 3×10^6 UI y puede ser al menos 1×10^7 UI, al menos 3×10^7 UI, al menos 1×10^8 UI, al menos 3×10^8 UI, al menos 1×10^9 UI o al menos 3×10^9 UI. En intervalos seleccionados, las CD de los órganos linfoides del receptor se pueden usar para medir la expresión, por ejemplo, observar la expresión de marcador, tal como GFP o luciferasa. Las técnicas de control de ácido nucleico y las mediciones de actividad de la transcriptasa inversa (TI) también se pueden usar para analizar la biodistribución de partículas víricas. Las células T de células mononucleares de sangre periférica, ganglios linfáticos, bazo o tejido infectado con patógenos malignos o diana de receptores tratados con partículas de vector lentivírico se pueden medir de la magnitud y durabilidad de la respuesta a estimulación de antígenos. En las células de tejido distintas de las CD, tales como células epiteliales y células linfoides, se puede analizar la especificidad de suministro de genes in vivo.

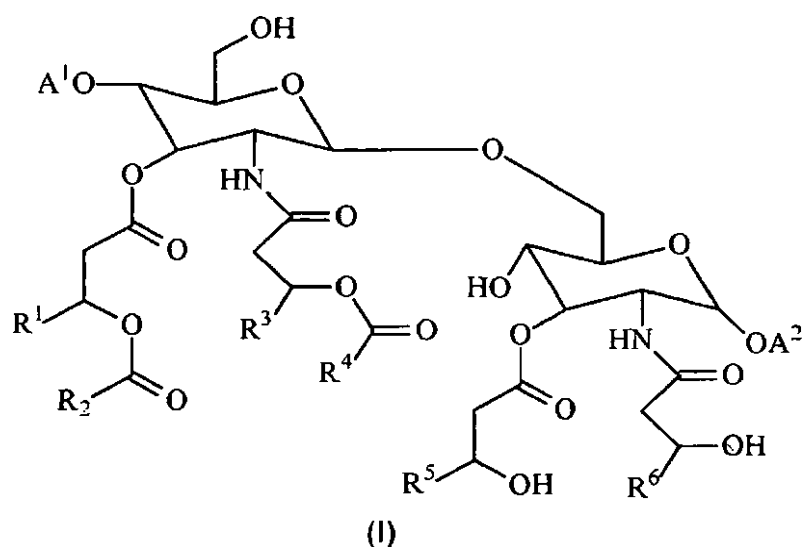
Está ampliamente convenido que el método potencial más eficaz para terminar la epidemia de SIDA (y otras enfermedades víricas) es una vacuna preventiva eficaz. Hasta la fecha, ningún método de vacunación contra VIH ha pasado con éxito una prueba de fase III. Así, hay una urgente necesidad de nuevas estrategias de vacunación eficaces. Una estrategia es la vacunación de las CD. En esta implantación, una secuencia que codifique una proteína vírica, tal como la descrita anteriormente, se clona en un vector vírico. Los pacientes son infectados con virus contruidos como se describe en la presente memoria. En un modelo animal, se pueden usar virus informadores de VIH clonado de manera molecular (NFNSZ-r-HSAS, NL-r-HSAS) y aislados clínicos para provocar a los animales por inyección en la vena de la cola. Se puede controlar la evidencia de infección con el tiempo en los esplenocitos, ganglios linfáticos y sangre periférica. La multiplicación PCR para VIH-proteína gag y citometría de flujo para HAS en el virus informador se puede usar para ensayar la integración y replicación víricas. La vacunación de CD in situ productiva puede aumentar la resistencia a una provocación de VIH.

Las vacunas con frecuencia incluyen un adyuvante. Las partículas de vector lentivírico descritas en la presente memoria también se pueden administrar junto con un adyuvante. El adyuvante se puede administrar con las partículas de virus recombinante, antes de las partículas de virus recombinante o después de las partículas de virus recombinante. Si se administra con las partículas de virus, los adyuvantes deseables no rompen de manera significativa la integridad de las partículas de virus, de manera que se rompa la membrana vírica que contiene las glucoproteínas de envoltura.

Se puede usar una variedad de adyuvantes en asociación con el virus para provocar una respuesta inmunitaria al antígeno codificado en el genoma de vector vírico. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca a un antígeno sin causar cambios conformacionales en el antígeno que afecten a la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferidos incluyen alumbre, monofosforil lípido A 3 Des-O-acilado (MPL, por sus siglas en inglés) (véase la patente británica GB 2220211). QS21 es un glucósido de triterpeno o saponina aislados de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina encontrado en América del Sur (véase Kensil et al., en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Popozo and Newman, Plenum Press, NY, 1.995); Patentes de EE.UU. N° 5.057.540). Otros adyuvantes son aceite en emulsiones acuosas (tal como escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunitarios, tales como monofosforil lípido A (véase Stoute et al., *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1.997)). Otro adyuvante es CpG (Bioworld Today, 15 de noviembre de 1.998). Alternativamente, A β se puede acoplar a un adyuvante. Por ejemplo, una versión de lipopéptido de A β se puede preparar por acoplamiento de ácido palmítico u otros lípidos directamente al N-terminal de A β , como se describe para vacunación de antígeno de la hepatitis B (Livingston, *J. Immunol.* 159, 1.383-1.392 (1.997)). Sin embargo, dicho acoplamiento no debería cambiar sustancialmente la conformación de A β a fin de afectar a la naturaleza de la respuesta inmunitaria al mismo. Se pueden administrar adyuvantes como componente de una composición terapéutica con un agente activo o se pueden administrar por separado, antes, al mismo tiempo con o después de administración del agente terapéutico.

Una clase de adyuvantes son sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio. Dichos adyuvantes se pueden usar con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como MPL o 3-DMP, QS21, aminoácidos poliméricos o monoméricos tales como ácido poliglutámico o polilisina. Otra clase de adyuvantes son formulaciones de emulsión de aceite-en-agua. Dichos adyuvantes se pueden usar con o sin otros agentes inmunoestimuladores específicos tales como muramil péptidos (por ej., N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn- -glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) teramida.TM.) u otros componentes de la pared celular bacteriana. Las emulsiones de aceite-en-agua incluyen (a) MF59 (patente internacional WO 90/14837), que contienen 5% de Escualeno, 0,5% de Tween 80 y 0,5% de Span (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE) formulado en partículas de submicrómetro usando un microfluidizador tal como microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton Mass.), (b) SAF, que contiene 10% de Escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero L121 bloqueado con plurónico y thr-MDP, microfluidizado en una emulsión en submicrómetros o sometido a agitador vorticial para generar una emulsión de tamaño de partícula mayor y (c) sistema adyuvante de Ribi (RAS, por sus siglas en inglés), (Ribi Inmunicon, Hamilton, Monte.) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en: monofosforilípidos A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS, por sus siglas en inglés), preferiblemente MPL+CWS (Detox™). Otra clase de adyuvantes preferidos son adyuvantes de saponina, tales como Stimulon. TM. (QS21, Aquila, Worcester, Mass.) o partículas generadas allí de tales como ISCOMs (complejos inmunoestimulantes) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen Adyuvante de Freund Completo (CFA, por sus siglas en inglés) y Adyuvante de Freund Incompleto (IFA, por sus siglas en inglés). Otros adyuvantes incluyen citocinas, tales como interleucinas (IL-1, IL-2 e IL-12), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF, por sus siglas en inglés), factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés).

Otro adyuvante que se puede usar con las composiciones en la presente memoria se identifica por la fórmula química (I):



en la que los restos A1 y A2 se seleccionan independientemente del grupo de: hidrógeno, fosfato y sales de fosfato. Sodio y potasio son contraiones ejemplares para las sales de fosfato. Los restos R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ se seleccionan independientemente del grupo de hidrocarbilo con 3 a 23 carbonos, representado por C₃-C₂₃. Para más claridad se explicará que cuando un resto se "selecciona independientemente de" un grupo especificado con múltiples miembros, se debería entender que el miembro elegido para el primer resto no impacta o limita de ningún modo la elección del miembro seleccionado para el segundo resto. Los átomos de carbono a que se unen R¹, R³, R⁵ y R⁶ son asimétricos, y así pueden existir en cualquier estereoquímica R o S. En una realización, todos esos átomos de carbono están en la estereoquímica R, mientras en otra realización todos esos átomos de carbono están en la estereoquímica S.

"Hidrocarbilo" se refiere a un resto químico formado completamente por hidrógeno y carbono, donde la disposición de los átomos de carbono puede ser cadena lineal o ramificada, no cíclica o cíclica, y el enlace entre átomos de carbono adyacentes puede ser completamente enlaces sencillos, es decir, para proporcionar un hidrocarbilo saturado o puede haber enlaces dobles o triples presentes entre dos cualesquiera átomos de carbono adyacentes, es decir, para proporcionar un hidrocarbilo insaturado y el número de átomos de carbono en el grupo hidrocarbilo está entre 3 y 24 átomos de carbono. El hidrocarbilo puede ser un alquilo, donde los alquilos de cadena lineal representativos incluyen: metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo y similares, incluyendo undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, etc.; mientras los alquilos ramificados incluyen: isopropilo, sec-butilo, isobutilo, terc-butilo, isopentilo y similares. Los hidrocarbilos cíclicos saturados representativos incluyen: ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares; mientras los hidrocarbilos cíclicos insaturados incluyen ciclopentenilo y ciclohexenilo y similares. Hidrocarbilos insaturados contienen al menos un enlace doble o triple entre átomos de carbono adyacentes (referido como un "alqueniilo" o "alquinilo", respectivamente, si el hidrocarbilo es no cíclico y cicloalqueni y cicloalquinilo, respectivamente, si el hidrocarbilo es al menos parcialmente cíclico). Los alqueniilos de cadena lineal y ramificados representativos incluyen: etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo y similares; mientras los alquinilos de cadena lineal y ramificados representativos incluyen: acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1-butinilo y similares.

El adyuvante de fórmula (I) se puede obtener por métodos sintéticos conocidos en la técnica, por ejemplo, la metodología sintética desvelada en la Publicación de Patente Internacional PCT N° WO 2009/035528, así como las publicaciones identificadas en la Patente Internacional WO 2009/035528. Algunos de los adyuvantes también se pueden obtener comercialmente. Un adyuvante preferido es el Producto N° 699800 como se identifica en el catálogo de Avanti Polar Lipids, Alabaster AL, véase E1 en combinación con E10, a continuación.

En diversas realizaciones de la invención, el adyuvante tiene la estructura química de fórmula (I) pero los restos A1, A2, R1, R2, R3, R4, R5 y R6 se seleccionan de subconjuntos de las opciones proporcionadas previamente para estos restos, donde estos subconjuntos se identifican a continuación por E1, E2, etc.

E1: A₁ es fosfato o sal de fosfato y A₂ es hidrógeno.

E2: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₃-C₂₁ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₅-C₂₃.

E3: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₅-C₁₇ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₇-C₁₉.

E4: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₇-C₁₅ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₉-C₁₇.

E5: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₉-C₁₃ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₁₁-C₁₅.

E6: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₉-C₁₅ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₁₁-C₁₇.

E7: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₇-C₁₃ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₉-C₁₅.

E8: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁-C₂₀ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₁₂-C₂₀.

E9: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₁₃.

5 E10: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son undecilo y R² y R⁴ son tridecilo.

En algunas opciones, cada uno de E2 a E10 se combina con la realización E1 y/o los grupos hidrocarbilo de E2 a E9 son grupos alquilo, preferiblemente grupos alquilo de cadena lineal.

10 El adyuvante de fórmula (I) se puede formular en una composición farmacéutica, opcionalmente con un co-adyuvante, cada uno como se discute a continuación. Con respecto a esto se hace referencia a la Publicación de Patente de EE.UU. N° 2008/0131466 que proporciona formulaciones, por ej., formulación acuosa (FA) y formulaciones de emulsión estables (ES) para adyuvante GLA, donde se pueden utilizar estas formulaciones para cualquiera de los adyuvantes de fórmula (I).

15 Se puede administrar un adyuvante con el virus de la invención como una única composición o se puede administrar antes, al mismo tiempo o después de la administración del virus recombinante de la invención. Se puede empaquetar y suministrar inmunógeno y adyuvante en el mismo vial o se puede empaquetar en viales separados y mezclar antes de su uso. Inmunógeno y adyuvante se empaquetan típicamente con una etiqueta que indica la aplicación terapéutica deseada. Si se empaquetan por separado inmunógeno y adyuvante, el empaquetamiento incluye típicamente instrucciones para mezclarlos antes de uso. La elección de un adyuvante y/o portador depende de la estabilidad de la vacuna que contiene el adyuvante, la vía de administración, el plan de dosificación, la eficacia del adyuvante para las especies que se vacunan y, en los seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que ha sido homologado o se puede homologar para administración a seres humanos por los órganos reguladores pertinentes. Por ejemplo, el adyuvante de Freund Completo no es adecuado para administración a seres humanos. Se prefieren alumbre, MPL y QS21. Opcionalmente, se pueden usar dos o más adyuvantes diferentes de manera simultánea, tal como alumbre con MPL, alumbre con QS21, MPL con QS21 y alumbre, QS21 y MPL juntos. También, se puede usar adyuvante de Freund Incompleto (Chang et al., Advanced Drug Delivery Reviews 32, 173-186 (1.998)), opcionalmente en combinación con cualquiera de alumbre, QS21 y MPL y todas las combinaciones de los mismos.

E. Composiciones farmacéuticas y estuches.

30 También se consideran en la presente memoria composiciones farmacéuticas y estuches que contienen un virus proporcionado en la presente memoria y uno o más componentes. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir partículas del vector vírico como se proporciona en la presente memoria y un portador farmacéutico. Los estuches pueden incluir las composiciones farmacéuticas y/o combinaciones proporcionadas en la presente memoria y uno o más componentes, tales como instrucciones para uso, un dispositivo para administración de un compuesto a un individuo y un dispositivo para administración de un compuesto a un individuo.

35 Se proporcionan en la presente memoria composiciones farmacéuticas que contienen partículas víricas como se proporcionan en la presente memoria y un portador farmacéutico adecuado. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente memoria pueden estar en diversas formas, por ej., en forma sólida, líquida, polvo, acuosa o liofilizada. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados son conocidos en la técnica. Dichos portadores y/o aditivos se pueden formular por métodos convencionales y se pueden administrar al individuo en una dosis adecuada. Los agentes estabilizantes tales como lípidos, inhibidores de la nucleasa, polímeros y agentes quelantes pueden conservar las composiciones de degradación en el cuerpo.

40 Las partículas del vector vírico proporcionadas en la presente memoria se pueden empaquetar como estuches. Los estuches pueden incluir opcionalmente uno o más componentes tales como instrucciones para uso, dispositivos y reactivos adicionales y componentes, tales como tubos, envases y jeringas para práctica de los métodos. Los estuches ejemplares pueden incluir los virus proporcionados en la presente memoria y pueden incluir opcionalmente instrucciones para uso, un dispositivo para detectar un virus en un individuo, un dispositivo para administración del virus a un individuo y un dispositivo para administración de un compuesto a un individuo.

45 Los estuches que comprenden polinucleótidos que codifican un gen de interés (típicamente un antígeno) también se consideran en la presente memoria. El estuche puede incluir al menos un plásmido que codifique componentes de empaquetamiento de virus y variante de glucoproteína E2 de virus Sindbis codificador del vector. Algunos estuches contendrán al menos componentes de empaquetamiento de un plásmido codificador de virus, una variante de glucoproteína E2 de virus Sindbis codificador del vector y un vector codificador de al menos un factor de maduración de CD.

50 Los estuches que comprenden un vector vírico codificador de una secuencia de interés (típicamente un antígeno) y opcionalmente, una secuencia de polinucleótidos codificadora de un factor de maduración de CD también se

consideran en la presente memoria. En algunos estuches, el estuche incluye al menos componentes de empaquetamiento de un plásmido que codifica el virus y una variante de glucoproteína E2 de virus Sindbis codificador del vector.

5 Un estuche también puede contener instrucciones. Las instrucciones incluyen típicamente una expresión tangible que describe el virus y opcionalmente otros componentes incluidos en el estuche y métodos para administración, incluyendo métodos para determinar el estado apropiado del individuo, la cantidad de dosis apropiada y el método de administración apropiado, para administración del virus. Las instrucciones también pueden incluir la guía para controlar al individuo por la duración del tiempo de tratamiento.

10 Los estuches proporcionados en la presente memoria también pueden incluir un dispositivo para administración de un virus a un individuo. Se puede incluir cualquiera de una variedad de dispositivos conocidos en la técnica para administración de medicamentos o vacunas en los estuches proporcionados en la presente memoria. Los dispositivos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, una aguja hipodérmica, una aguja intravenosa, un catéter, un dispositivo de inyección sin aguja, un inhalador y un dispensador líquido, tal como un gotero. Típicamente, el dispositivo para administración de un virus del estuche será compatible con el virus del estuche; por ejemplo, se puede incluir un dispositivo de inyección sin aguja tal como un dispositivo de inyección a alta presión en estuches con virus no dañados por inyección a alta presión, pero típicamente no se incluye en estuches con virus dañados por inyección a alta presión.

20 Los estuches proporcionados en la presente memoria también pueden incluir un dispositivo para administración de un compuesto, tal como un activador o estimulador de CD, a un individuo. Se puede incluir cualquiera de una variedad de dispositivos conocidos en la técnica para administración de medicamentos a un individuo en los estuches proporcionados en la presente memoria. Los dispositivos ejemplares incluyen una aguja hipodérmica, una aguja intravenosa, un catéter, una inyección sin aguja, pero no se limitan a, una aguja hipodérmica, una aguja intravenosa, un catéter, un dispositivo de inyección sin aguja, un inhalador y un dispensador líquido tal como un gotero. Típicamente el dispositivo para administración del compuesto del estuche será compatible con el método de administración deseado del compuesto.

Los siguientes ejemplos se ofrecen como ilustración y no como manera de limitación.

Ejemplos

Ejemplos 1

Ingeniería de una variante de envoltura de virus Sinbis.

30 El virus Sindbis (VS)—un miembro del género Alphavirus y la familia Togaviridae —es capaz de infectar las CD, probablemente a través de CD-SIGN (Klimstra, W. B., et al. 2.003. J. Virol. 77: 12.022-12.032, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad). El receptor vírico canónico para la cepa de laboratorio de VS sin embargo, es sulfato de heparán de superficie celular (SH), que se encuentra en muchos tipos de células (Strauss, J. H., et al. 1.994. Arch. Virol. 9: 473-484; Byrnes, A. P., y D. E. Griffin. 1.998. J. Virol. 72: 7.349-7.356. Para intentar reducir la unión de sulfato de heparán, se construyó una envoltura de E2 mutante (denominado SVGmu) por Wang et al. (Patente de EE.UU. 2008/0019998). Parte de su estrategia implicaba la supresión de cuatro aminoácidos en la unión de pro-proteína E3/E2 y una supresión de dos aminoácidos con una adición posterior de una secuencia de 10 aminoácidos de hemaglutinina (véanse las Figuras 1A y 1B). La proteína E2 resultante se expresa como una fusión de E3 y E2 (también conocida como pE2) debido a que se rompió la secuencia de escisión natural y también muestra un epítipo extraño (hemaglutinina). Como se muestra a continuación, SVGmu experimenta bajos niveles de expresión entre otros problemas.

45 Usando una estrategia diferente, los autores han logrado la glucoproteína E2 de virus Sindbis para disminuir la unión a sulfato de heparán, aumentar la especificidad con células dendríticas y mejorar la expresión. Una propuesta general para conseguir estas características es aumentar la infectividad de células dendríticas cambiando el resto 160 de E2 (restos 233 en la Figura 1) a un aminoácido no ácido, especialmente un aminoácido distinto de alanina o suprimirlo, para disminuir la unión de heparina por reducción de la carga neta positiva de la proteína, para retirar el epítipo de HA (hemaglutinina) y restablecer un sitio de escisión en el N-terminal de E2, en este caso un sitio de escisión de furina. Como parte de una envoltura vírica, estas glucoproteínas E2 pueden mediar la infección de las CD así como han reducido o anulado la infección de otros tipos de células.

50 Después de estos principios, se diseñaron diversas secuencias de variante de E2 y se muestran en la siguiente tabla. El tipo de letra en negrita indica un cambio de la secuencia de envoltura de virus Sindbis de la cepa HR (GenBank NC 001547.1).

SEC ID N°:	70	76	159	160
3	E	K	E	G
4	E	E	E	G
5	E	K	Δ	Δ
6	E	E	E	Δ
7	K	K	E	G
8	K	K	E	Δ
9	K	E	E	G
10	K	E	E	Δ
11	K	E	K	G
12	K	E	K	Δ
13	E	K	K	G
14	E	K	K	Δ
15	E	E	K	G
16	E	E	K	Δ

Se sintetizaron secuencias de ácidos nucleicos que codifican algunas de las variantes (véase también la Figura 1), incluyendo secuencias de ácidos nucleicos que están optimizadas en el codón para seres humanos. Los ADN para las variantes se clonaron en un vector de expresión, tal como pcDNA3.

Ejemplo 2

- 5 Preparación de una partícula de vector vírico que comprende una variante de glucoproteína de envoltura E2 de virus Sindbis.

Se prepara un virus pseudotipificado de envoltura Sindbis por transfección clásica transitoria mediada por fosfato de calcio de células 293T con un vector lentivírico, tal como FUGW o sus derivados, plásmidos de empaquetamiento que codifican gag, pol y rev, y una secuencia de envoltura de virus Sindbis de la variante. FUGW es un vector lentivírico auto-inactivante que soporta el activador de ubiquitina-C humana para conducir la expresión de un gen informador de GFP (Lois, C., et al. 2.002. Science 295: 868-872). Los vectores lentivíricos de transferencia (FUGW y sus derivados) son vectores lentivíricos a base VIH de tercera generación (véase en general, Cockrell and Kafri Mol. Biotechnol. 36: 184, 2.007), en que se suprime la mayor parte de la región U3 de la LTR 3', dando como resultado una LTR 3' auto-inactivante.

- 15 Se realizó la producción de vectores lentivíricos recombinantes por transfección transitoria mediada por fosfato de calcio (CaPO₄) de células 293T (estirpe celular 293LTV; CELL BIOLABS INC, LTV-100). Se transfectaron células 293T con cuatro plásmidos precipitados junto con CaPO₄. Los siguientes cuatro plásmidos se usaron para producir preparaciones de vector lentivírico se muestran de manera esquemática en la **Figura 3** y corresponden a lo siguiente: i) vector lentivírico; ii) plásmido que codifica Rev de VIH; iii) plásmido que codifica Gag/Pol de VIH y, iv)
- 20 plásmido que codifica la envoltura. Los vectores lentivíricos pueden codificar los antígenos deseados o elementos inmunomoduladores y contienen supresiones fijadas como objetivo particulares para prevenir la integración en el cromosoma huésped de las células infectadas. Más ejemplos de plásmidos alternativos que pueden ser utilizados para transfección transitoria incluyen los que codifican una holoenzima polimerasa que alberga una mutación en su integrasa haciéndola anormal, tal como la mutación D64V descrita en la presente memoria. Para ciertos fines, el
- 25 plásmido que codifica la envoltura puede codificar una envoltura pantrópica que no fija como objetivo CD tal como VSV-G.

Para los experimentos descritos en la presente memoria, las precipitaciones de CaPO₄ que contienen 120 µg de vector y 60 µg de cada uno de los plásmidos Gag/Pol y Rev y 240 µg de plásmido de la envoltura que se filtraron a través de un filtro de tamaño de poro 0,45 µm y se añadieron a aproximadamente 6 x 10⁷ células 293T cultivadas en frascos rotativos y que contenían 75 ml de medio DMEM enriquecido con suero fetal bovino al 10%. A las 6 horas post-transfección, se reemplazó el medio con 100 ml de medio fresco y se recogió a las 36 horas post-transfección. Se centrifugaron los sobrenadantes del cultivo a baja velocidad (126 rad/s (1.200 rpm)) para

sedimentar partículas celulares seguido por filtración a través de filtros de 0,45 µm. El líquido filtrado que contiene la preparación de vector lentivírico se concentró opcionalmente por centrifugación a 17.700 x g durante 5 horas a 20°C. El vector lentivírico sedimentado se resuspendió después en PBS en un volumen deseado. Este procedimiento proporcionó típicamente $\geq 5 \times 10^5$ UI/ml usando la envoltura de glucoproteína de virus Sindbis descrita en la presente memoria o 5×10^7 UI totales para cada cultivo de frasco rotativo. Más típicamente este procedimiento proporcionó al menos 1×10^8 UI totales para cada cultivo de frasco rotativo.

Con más detalle, el día -4, se añadieron 150 ml de medio de cultivo celular a Frascos Rotativos (RB, por sus siglas en inglés) que se ponen en una incubadora de estante rotativo a 37°C (0,02 rad/s (0,2 rpm)) durante ~1 h. En cada RB se pasan platos de 15 cm confluentes. El día -2, se aspira medio de los RB y se reemplazan con 100 ml de medio precalentado. El día -1, se siembran las células en la preparación para transinfección. Los RB se precalientan con 100 ml de medio de cultivo celular durante ~1 h. Se aspira el medio y se añaden 10-12 ml de PBS. Los RB se ponen en su lado y rotados dos veces alrededor para recubrir las células. Se aspira el PBS y se añaden 10-12 ml de disolución de tripsina. Se ponen de nuevo los RB sobre sus lados y se rotan dos veces alrededor para recubrir las células. Se aspira la disolución de tripsina y los RB se ponen en la incubadora durante 5 min. A los RB, se añaden 10 ml de medio calentado y se rotan vigorosamente los RB una vez alrededor para desunir las células. Usando una pipeta de 10 ml, se pipetea células arriba y abajo durante por ej., 10 veces para asegurar una única suspensión celular. Se retiran las células a un nuevo envase y se diluyen con medio (40 ml de medio por RB). Se cuentan las células y se siembran en RB frescos a 7×10^7 /ml y se mantienen en la incubadora durante la noche.

El día 0, a aproximadamente 22 h post-siembra, se preparó la disolución de plásmido como sigue. Para cada RB, se mezcla junto una disolución de plásmido (120 µg de vector, 60 µg de Gag/Pol, 60 µg de Rev, 60 µg de envoltura), 2,5 ml de CaCl_2 1,25 M y agua estéril filtrada a 12,5 ml de volumen final. Se añaden 2,7 ml de tampón 2xHBS (HEPES 50 mM, KCl 10 mM, dextrosa 12 mM, NaCl 280 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM, pH 7,0, filtrado estéril) en un tubo de 50 ml (un tubo / RB).

Se añaden 12,7 ml de mezcla de agua- CaCl_2 -ADN gota a gota a 12,7 ml de 2xHBS mientras se somete a agitación vorticial a ajuste medio. Se tapa el tubo y se continúa con agitación vorticial (máx. velocidad) durante 5-10 segundos. Se retiran 25 ml de medio de RB y se añade precipitado (25 ml) a RB. Se incuba 6 h, después se separa por aspiración del medio y se añaden 100 ml de medio de cultivo celular precalentado, fresco. Se vuelve a poner en incubadora a 37°.

A 36 a 48 h post-transinfección, los sobrenadantes de RB se recogieron en un tubo cónico de 250 ml y se trataron como sigue. Se centrifugaron los sobrenadantes durante 10 min a 209 rad/s (2.000 rpm). Se filtraron los sobrenadantes a través de un filtro de 0,45 µm. Se centrifugaron los sobrenadantes en un tubo de 500 ml durante 5 h a 105 rad/s (10.000 rpm) a 20°C. Se resuspendió vector en PBS o HBSS a la concentración deseada y se almacenó a -80°C.

Los vectores víricos pseudotipificados resultantes se refieren a partir de ahora como FUGW/V1, FUGW/V2, etc. Los genomas de vectores víricos envueltos con la glucoproteína VSV-G se refieren a partir de ahora como FUGW/VSV-G.

Ejemplo 3

Producción de partículas de vector lentivírico que comprenden glucoproteínas de envoltura de virus Sindbis.

En este ejemplo, se determinaron los títulos para los vectores lentivíricos pseudotipificados con diferentes envolturas de virus Sindbis. Las glucoproteínas E2 usadas fueron SIN-Var1 (SEC ID N° 3), SIN-Var2 (SEC ID N° 4), SIN-Var3 (SEC ID N° 5), SVGmu (SEC ID N° 2), HR (SEC ID N° 18).

Se generaron partículas de vector lentivírico pseudotipificadas de glucoproteínas de virus Sindbis por transinfección de células 293T como se describe en el Ejemplo 2. Se recogieron los sobrenadantes brutos 48 horas post-transinfección y se usaron para transducir células 293T que expresan CD-SIGN humana (293-CDSIGN) que se habían puesto en placas de 6 pozos el día anterior en 2E5 células/pozo. Se determinó el título después de una incubación de 72 h a 37°C analizando las células transducidas en un citómetro Guava Easy-Cyte (Millipore). Se contaron 25.000 procesos totales para determinar el porcentaje de células transducidas GFP+, que se usó a su vez para calcular el título GFP (UI, unidades infecciosas) para cada virus.

Para facilitar el estudio de transducción fijada como objetivo, se construyen estirpes celulares que expresan CD-SIGN humanas. Las estirpes celulares son generadas por transducción estable de células 293T parentales con un lentivector pseudotipificado VSVG que contiene la secuencia codificadora para CD-SIGN humana. Se multiplica ADNc para CD-SIGN humana de plásmidos pUNO-hCDSIGN1Aa (InvivoGene) y se clonó aguas abajo del activador de ubiquitina-C humana en el plásmido lentivírico FUW para generar FUW-hCDSIGN. Alternativamente, se generan estirpes celulares por transducción estable de células 293T parentales con un vector (no lentivírico) anfotrópico pseudotipificado de VSVG que contiene la secuencia codificadora para CD-SIGN, para facilitar mejor el análisis de transducción basado en ácidos nucleicos aguas abajo por partículas del vector lentivírico. Los lentivectores o vectores anfotrópicos se pseudotipifican después con VSVG y se usan para transducir células 293T. Alternativamente, se generan estirpes celulares por transducción estable de células 293T parentales con un

plásmido que codifica CD-SIGN humana. Las células resultantes se someten a tinción con anticuerpos (anticuerpo CD-SIGN anti-humano (BD Biosciences) y clasificación de células para proporcionar una población uniforme de estirpes celulares de CD-SIGN+.

5 En tres experimentos independientes, el vector lentivírico pseudotipificado con envoltura SIN-Var1 presentó títulos aproximadamente 10 veces mayores que los títulos pseudotipificados con SVGmu o con la cepa HR de virus Sindbis (Figura 3, gráfica superior). En un estudio posterior, se comparó la productividad de tres variantes de envoltura Sindbis. Se muestra un resultado representativo. Las envolturas Sin-Var1, Sin-Var2 y SIN-Var3 generan partículas del vector lentivírico con similar título total.

10 La especificidad de las partículas del vector vírico que comprenden una glucoproteína E2 de la variante de virus Sindbis se evalúa por transducción del 293T.hCD-SIGN o las células 293T parentales y la medición de la expresión de un marcador visible (por ej., GFP) en las estirpes celulares.

15 Se sembraron células diana (293T.hCD-SIGN o células 293T) en una placa de cultivo de 24 pozos ($0,2 \times 10^6$ células por pozo) y se transdujeron con sobrenadantes víricos (1 ml por pozo) centrifugando las placas a 262 rad/s (2.500 rpm) y 30°C durante 90 min. Con posterioridad, los sobrenadantes son reemplazados con medio de cultivo fresco y se incubaron durante 3 días a 37°C. El porcentaje de células que expresan el marcador se mide por citometría de flujo.

Como se muestra en la tabla a continuación, tanto la variante 1 de E2 como la variante 3 de E2 fijaron como objetivo preferentemente células (son específicas para las células) que expresan hCD-SIGN.

Tabla 1			
Envoltura	Tipo de Célula	GFU/ml	Relación
VSV-G	hCD-SIGN	1,35E+08	1,19
	293T	1,13E+08	
Sin-Var3 (Exp 1)	293-hCD-SIGN	4,2E+07	35,4
	293T	1,2E+06	
Sin-Var3 (Exp 2)	hCD-SIGN	8,12E+07	11,09
	293T	7,33E+06	
Sin-Var2	293-hCD-SIGN	1,7E+08	18,2
	293T	9,1E+06	
Sin-VAR-1	hCD-SIGN	2,93E+08	13,75
	293T	2,13E+07	
Sin-HR	293-hCD-SIGN	6,4E+06	9,4
	293T	6,8E+05	
SVGmu (Exp 1)	293-hCD-SIGN	3,4E+06	27,0
	293T	1,3E+05	
SVGmu (Exp 2)	hCD-SIGN	4,65E+06	12,24
	293T	3,80E+05	

20 Ejemplo 4

Inmunogenicidad de partículas de vector lentivírico que comprende glucoproteínas de envoltura de virus Sindbis.

25 En este Ejemplo, se evalúa la inmunogenicidad para vectores lentivíricos pseudotipificados con diferentes envolturas de virus Sindbis. Más específicamente, la cantidad de células T CD8 específicas del antígeno y se determinaron sus perfiles de secreción de citocina. Las glucoproteínas E2 usadas fueron SIN-Var1 (SEC ID N° 3), SIN-Var2 (SEC ID N° 4), SIN-Var3 (SEC ID N° 5), SVGmu (SEC ID N° 2).

El genoma vírico comprende secuencia que codifica Ovalbúmina (OVA). Se generaron partículas del vector lentivírico por transfección de células 293T como se describe en el Ejemplo 2. Se recogieron los sobrenadantes y la cantidad de p24 determinada usando un estuche ELISA (Advanced Bioscience Labs, Kensington MD). La proteína p24 es una proteína de núcleo de VIH encontrada en los viriones pseudotipificados y un producto del gen gag. Los ratones C57BL/6 (5 ratones por grupo) se inmunizaron por vía subcutánea con lentivector deficiente de integración que codifica ovalbúmina OVA. El número y la función de células T CD8 específicas de péptido de OVA257 (SIINFEKL) (SEC ID N° 24) y los perfiles de secreción de citocina en el bazo se determinaron el día 9 por multímero CPH-I/péptido y tinción intracelular de citocinas.

En pocas palabras, se extrajeron y se homogeneizaron bazos por presión a través de un filtro de nailon de 70 μ M. Se lisaron los glóbulos rojos por choque hipotónico por exposición breve a agua destilada y restablecimiento inmediato a un entorno isotónico con adición de PBS x10. Se tiñeron aproximadamente 5×10^6 esplenocitos por muestra con pentámero H-2Kb/OVA257 marcado con PE (Prolimmune) a 25°C en PBS con FCS al 2% y EDTA 2 mM (tampón de FACS). Se lavaron después dos veces las células y se tiñeron con el colorante de viabilidad LIVE/DEAD Infrarrojo Cercano (L/D NIR; Invitrogen) y los siguientes anticuerpos marcados con fluorocromo: Azul Pacífico CD44 FITC, CD19 PerCP-Cy5.5 y CD8 (eBioscience) a 4°C. Se recogieron datos en un citómetro de flujo BD LSR II (50.000 procesos CD8+) y se analizaron con el programa informático FlowJo (TreeStar). La estrategia de regulación para identificar células TCD8 fue como sigue: linfocitos (dispersión delantera baj-med, dispersión lateral baj), células solas (área dispersión lateral = altura dispersión lateral), células vivas (L/D NIR-), células T CD8 (CD8+ CD19-). Se determinó el porcentaje de células que expresan IFN- γ en la ventana CD8+ y se representó en la Figuras 4A y 4B. La línea horizontal representa valores medios. Se determinó la tinción con IFN- γ no específico en células de bazo de ratones inyectados con vehículo (HBSS) en que se estimularon las células in vitro con péptido. La tinción con IFN- γ estuvo por debajo de 0,2% para todas las muestras cultivadas sin péptido (no mostrado). Además de la fracción de células T CD8 que produce IFN- γ , también se representa la fracción de células de IFN- γ + que producen también TNF α y/o IL-2, como se indica en la clave.

En una serie de experimentos, la cantidad de virus usada contenía 2.500 ng o 125 ng de p24. La Figura 4A ilustra que los lentivectores pseudotipificados con envolturas de la variante de Sindbis presentan similar actividad in vivo. Como se muestra en el panel más a la izquierda, la media de células T CD8 específicas del antígeno es esencialmente la misma en dos cantidades de dosis diferentes. Además, el porcentaje medio de células IFN- γ es también similar. Los patrones de secreción de citocina, específicamente la fracción de células positivas gamma-IFN que también expresa IL-2 o TNF-alfa, son también similares, con el mayor porcentaje de células I IFN- γ que es negativo para IL-2 y TNF- α .

En otra serie de experimentos, los grupos de 5 ratones recibieron una dosis de dilución en serie de virus o vehículo. El virus se pseudotipificó con SinVar1 o SVGmu. El porcentaje de células con un fenotipo de pentámero CD44hi H-2Kb/OVA257 se representó en la Figura 4B. La línea de conexión representa valores medios. Como se muestra en la Figura 4B, LV pseudotipificado con SinVar1 indujo expansión sustancialmente mayor de células T CD8 específicas del antígeno que SVGmu. Por otra parte, los lentivectores pseudotipificados con SinVar1 indujeron una respuesta de células T CD8 funcional mayor que SVGmu (Figura 4C). Se determinó la tinción de IFN- γ no específica en ratones inyectados con HBSS (vehículo) reestimulado con péptido. La tinción con IFN- γ estuvo por debajo de 0,2% para todas las muestras cultivadas sin péptido (no mostrado).

Ejemplo 5

Construcción de vectores lentivíricos de no integración (NILV).

Se construyó una variedad de vectores lentivíricos de no integración. Se muestra un esquema de los vectores lentivíricos ejemplares en la Figura 5A. El dibujo superior muestra un vector en una forma de provirus. Todos los vectores contienen donadores de empalme, señal de empaquetamiento (psi), un elemento sensible a Rev (RRE), donador de empalme, receptor de empalme, tramo de polipurina central (cPPT) y elemento WPRE. Además, todas las construcciones de vectores contienen un activador para la expresión en células de mamífero y una secuencia de interés, marcada "antígeno" en la construcción ejemplar. Los activadores utilizados en los Ejemplos incluyen el activador de ubiquitina C humana (UbiC), el activador temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) y el activador de virus de sarcoma de Rous (RSV).

Una vista con zoom de la región U3 se muestra a continuación como una caja abierta con el PPT (tramo de polipurina) secuencia inmediatamente aguas arriba. A continuación se muestran tres diferentes regiones U3 en forma esquemática; sus secuencias se muestran en la Figura 5B y las SEC ID Nos: 21-23. Las construcciones contienen supresiones en las regiones U3. La construcción SIN presenta una supresión de aproximadamente 130 nucleótidos en la U3 (Miyoshi, et al. J Virol 72: 8.150, 1.998; Yu et al. PNAS 83: 3.194, 1.986), que elimina la caja TATA, que suprime la actividad de activador LTR. Las supresiones en las construcciones 703 y 704 aumentan la expresión de los vectores lentivíricos (Bayer et al. Mol Therapy 16: 1.968, 2.008). Además, la construcción 704 contiene una supresión del PPT 3', que disminuye la integración del vector (patente internacional WO 2009/076524). Las secuencias de la región U3 de todas las construcciones se muestran en la figura 5B. La PPT 3' empieza en la posición 3 y se muestran las supresiones extendidas relativas al vector suprimido de SIN.

Ejemplo 6

Expresión en células dendríticas después de transducción con partículas de vector lentivírico.

Este Ejemplo muestra el nivel de expresión de GFP (proteína fluorescente verde) en células dendríticas generadas a partir de vectores con supresiones U3 extendidas.

- 5 Se produjo una serie de virus por transfección de células 293T como se describió anteriormente. Todos los virus comprendían una envoltura SIN-Var1, un genoma del vector que contiene un activador de UbiC o de CMV en unión operativa con un transgen de GFP, y una integrasa deficiente debido a que contiene una mutación D64V. Se recogieron sobrenadantes brutos 48 horas post-transducción y se usaron volúmenes equivalentes de cada sobrenadante para transducir células 293T-CDSIGN. La expresión de GFP se determinó 72 horas post-transducción usando un citómetro de flujo GUAVA Easy-Cyte. Se contó un total de 50.000 procesos para cada población de células transducidas. Se analizaron datos usando el programa informático de análisis citométrico FlowJo.

- 10 Se obtuvieron resultados similares con los dos activadores UbiC (Figura 6, panel A) y CMV (Figura 6, panel B). Los vectores lentivíricos que contienen supresiones de U3 extendidas (703 y 704) mostraron una expresión de transgenes total mayor respecto a vectores con SIN suprimido. La supresión del PPT en la construcción 704 disminuyó la expresión ligeramente con respecto a la construcción 703.

Ejemplo 7

Los vectores con grandes supresiones en U3 son de no integración.

- 20 Este ejemplo demuestra la eficacia de integración relativa de vectores pseudotipificados SIN-Var1 que contienen combinaciones de diferentes supresiones de vector con integrasa deficiente o de tipo natural después de transducción de células 293-CD-SIGN.

- Se generaron stocks de vectores con una serie de diferentes combinaciones de genes de Integrasa y supresiones U3. Los vectores con las supresiones U3 (véanse las Figuras 5A y 5B), SIN, 703 y 704 se transfectaron como anteriormente con gen integrasa de tipo natural o un gen de integrasa mutante. Los vectores en estos experimentos contienen un transgen GFP-2A-Neo que codifica resistencia tanto de GFP como de G418. Los marcos de lectura se unen vía un péptido de auto-escisión 2A para generar proteínas individuales. Los títulos de GFP para todos los stocks de vectores se determinaron usando métodos de flujo citométrico clásicos. Se usaron después stocks de vectores para infectar células 293-CD-SIGN puestas en placas el día previo en placas de 6 pozos a 5×10^5 células/pozo. Después de transducción, las células se trataron con tripsina cada 72 horas. En cada pase, se volvieron a poner en placas 2×10^5 células en placas de 6 pozos en 2 ml de DMEM + FBS al 10%. Las células restantes se usaron para determinar el número de células GFP+ por citometría de flujo.

- 30 En la Figura 7, el título GFP relativo se presenta como una fracción del título observada en el pase uno. La pérdida de expresión de GFP refleja la pérdida del transgen de GFP, que es una consecuencia de la pérdida de integración en la etapa de transducción inicial. Como se espera, se encontró que todos los virus que contenían una integrasa (IN-) de mutante D64V eran de no integración. Además, se encontró que los virus que contenían una supresión de PPT (704) eran deficientes en integración incluso en la presencia de un gen IN de tipo natural. Esto muestra que la supresión del PPT 3' proporciona un mecanismo de seguridad redundante en combinación con una mutación de integrasa.

Ejemplo 8

Los vectores lentivíricos de integración y de no integración son inmunogénicos de manera equivalente.

- 40 En este Ejemplo, se evalúan las respuestas de células T CD8 después de inmunización con virus de integración o de no integración.

- Se inmunizaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea con 2.5×10^{10} genomas de lentivector de integración (Int^{wt}) o no integración (Int^{D64V}) que codifica el antígeno Gag de virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV). El número y la función de células T CD8 específicas de Gag de SIV en el bazo se determinó el día 10 por tinción intracelular de citocinas, como se describió anteriormente, con la excepción de que el péptido derivado de Gag de SIV AAVKNWMTQTL se usó para reestimulación. La Figura 8 ilustra que los lentivectores de no integración puedan provocar una respuesta de células T CD8 equivalente para lentivectores de integración. Por otra parte, el patrón de expresión de citocina es similar.

Ejemplo 9

- 50 La inmunización con DC-NILV proporciona efecto terapéutico.

En este Ejemplo, los ratones que han recibido células tumorales se tratan por inmunización con DC-NILV que expresa un antígeno tumoral.

Se inyectaron a ratones BALB/c por vía subcutánea 2×10^4 células de carcinoma de colon CT26. Un día después, los ratones se trataron por vía subcutánea con vehículo o una preparación de partículas de vector lentivírico pseudotipificado con SINvar1 que contenía 3,2 µg de proteína de cápside p24. La envoltura del vector vírico comprende una variante de E2 de virus Sindbis como se describió anteriormente y el vector es de no integración y codifica el péptido AH1A5 (SPSYAYHQF; SEC ID N° 25), un epítipo de células T CD8 gp70 de MMTV modificado que es un antígeno de rechazo relevante para células tumorales CT26. Se representa el crecimiento tumoral inicial así como la supervivencia a largo plazo de ratones de inmunizados frente a los de control. La Figura 9 muestra que el tumor creció más lentamente en ratones que recibieron DC-NILV y además, la tasa de supervivencia (medido por 75 días) fue sustancialmente mejor (60% de supervivencia comparado con 20%). Por lo tanto, los lentivectores no integrantes que fijan como objetivo CD (DC-NILV) son eficaces en el tratamiento terapéutico de tumores.

Listado de secuencias

<110> Immune Design Corporation
 <120> Vectores Lentivíricos Pseudotipificados con una Glicoproteína de Envoltura de Virus Sindbis
 <130> IDC 203PC
 <160> 27
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> Virus Sindbis

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (160)..(160)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se encuentre en la naturaleza
 <400> 1

 Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys
 1 5 10 15

 Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu
 20 25 30

 Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser
 35 40 45

 Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr
 50 55 60

 Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr Met
 65 70 75 80

 Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser Tyr
 85 90 95

 Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val Thr
 100 105 110

 Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala Arg
 115 120 125

 Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro Pro
 130 135 140

 Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys Xaa
 145 150 155 160

ES 2 455 544 T3

Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr
165 170 175

Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro
180 185 190

Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr
195 200 205

Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys
210 215 220

Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser
225 230 235 240

Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His
245 250 255

Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His
260 265 270

Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
275 280 285

Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
290 295 300

Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
305 310 315 320

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
325 330 335

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
340 345 350

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
355 360 365

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
370 375 380

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
385 390 395 400

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
405 410 415

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
420

<210> 2
<211> 986
<212> PRT
<213> Virus Sindbis

<400> 2

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Ser Val Ile
50 55 60

Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys Ser Tyr Cys
65 70 75 80

His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile Glu Gln Val Trp
85 90 95

Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr Ser Ala Gln Phe
100 105 110

Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys Tyr Arg Tyr Met
115 120 125

Ser Leu Lys Gln Met Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Thr Val
130 135 140

Lys Glu Gly Thr Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys
145 150 155 160

Arg Arg Leu Ser Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro
165 170 175

Gly Asp Ser Val Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser
180 185 190

Cys Thr Leu Ala Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys
195 200 205

Tyr Asp Leu Pro Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr
210 215 220

ES 2 455 544 T3

Asp Arg Leu Ala Ala Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro
 225 230 235 240
 Arg Pro His Ala Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val
 245 250 255
 Tyr Ala Lys Pro Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys
 260 265 270
 Gly Asp Tyr Lys Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly
 275 280 285
 Cys Thr Ala Ile Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys
 290 295 300
 Trp Val Phe Asn Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala
 305 310 315 320
 Gln Gly Lys Leu His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met
 325 330 335
 Val Pro Val Ala His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile
 340 345 350
 Ser Leu Gln Leu Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg
 355 360 365
 Leu Gly Ala Asn Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr
 370 375 380
 Val Arg Asn Phe Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly
 385 390 395 400
 Asn His Glu Pro Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp
 405 410 415
 Pro His Gly Trp Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His
 420 425 430
 Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met
 435 440 445
 Ile Gly Val Thr Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu
 450 455 460
 Cys Leu Thr Pro Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser
 465 470 475 480

ES 2 455 544 T3

Leu Ala Leu Leu Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr
 485 490 495
 Glu Thr Met Ser Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val
 500 505 510
 Gln Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys
 515 520 525
 Ser Cys Cys Leu Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys
 530 535 540
 Val Asp Ala Tyr Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile
 545 550 555 560
 Pro Tyr Lys Ala Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu
 565 570 575
 Glu Ile Thr Val Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu
 580 585 590
 Tyr Ile Thr Cys Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys
 595 600 605
 Cys Cys Gly Ser Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Gly Tyr Thr
 610 615 620
 Cys Lys Val Phe Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln
 625 630 635 640
 Cys Phe Cys Asp Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu
 645 650 655
 Leu Ser Ala Asp Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His
 660 665 670
 Thr Ala Ala Met Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr
 675 680 685
 Ser Phe Leu Asp Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys
 690 695 700
 Asp Leu Lys Val Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe
 705 710 715 720
 Asp His Lys Val Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe
 725 730 735

Pro Glu Tyr Gly Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala
740 745 750

Thr Ser Leu Thr Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu
755 760 765

Leu Lys Pro Ser Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser
770 775 780

Ser Gly Phe Glu Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu
785 790 795 800

Thr Ala Pro Phe Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val
805 810 815

Asp Cys Ser Tyr Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala
820 825 830

Ala Phe Ile Arg Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys
835 840 845

Glu Val Ser Glu Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr
850 855 860

Leu Gln Tyr Val Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His
865 870 875 880

Ser Ser Thr Ala Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys
885 890 895

Gly Ala Val Thr Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe
900 905 910

Ile Val Ser Leu Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys
915 920 925

Pro Pro Ala Asp His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu
930 935 940

Phe Gln Ala Ala Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu
945 950 955 960

Phe Gly Gly Ala Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala
965 970 975

Cys Ser Met Met Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980 985

<210> 3

ES 2 455 544 T3

<211> 982
 <212> PRT
 <213> Virus Sindbis

<400> 3

```

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1          5          10          15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
          20          25          30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
          35          40          45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
          50          55          60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
          65          70          75          80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
          85          90          95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
          100          105          110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
          115          120          125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
          130          135          140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
          145          150          155          160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
          165          170          175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
          180          185          190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
          195          200          205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu
          210          215          220

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
          225          230          235          240
    
```

ES 2 455 544 T3

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
 245 250 255
 Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
 275 280 285
 Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
 290 295 300
 Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
 305 310 315 320
 His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
 325 330 335
 His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
 340 345 350
 Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
 355 360 365
 Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
 370 375 380
 Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
 385 390 395 400
 Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
 405 410 415
 Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
 420 425 430
 Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
 435 440 445
 Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
 450 455 460
 Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
 465 470 475 480
 Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
 485 490 495

ES 2 455 544 T3

Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
 500 505 510
 Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
 515 520 525
 Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
 530 535 540
 Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
 545 550 555 560
 Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
 565 570 575
 Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
 580 585 590
 Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
 595 600 605
 Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
 610 615 620
 Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
 625 630 635 640
 Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
 645 650 655
 Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
 660 665 670
 Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
 675 680 685
 Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
 690 695 700
 Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
 705 710 715 720
 Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
 725 730 735
 Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
 740 745 750
 Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser

ES 2 455 544 T3

755		760		765
Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu				
770		775		780
Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe				
785		790		795
Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr				
	805		810	815
Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg				
	820		825	830
Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu				
	835		840	845
Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val				
	850		855	860
Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala				
865		870		875
Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr				
	885		890	895
Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu				
	900		905	910
Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp				
	915		920	925
His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala				
	930		935	940
Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala				
945		950		955
Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met				
	965		970	975
Leu Thr Ser Thr Arg Arg				
	980			

<210> 4
 <211> 982
 <212> PRT
 <213> Virus Sindbis
 <400> 4

ES 2 455 544 T3

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

ES 2 455 544 T3

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
 275 280 285
 Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
 290 295 300
 Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
 305 310 315 320
 His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
 325 330 335
 His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
 340 345 350
 Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
 355 360 365
 Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
 370 375 380
 Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
 385 390 395 400
 Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
 405 410 415
 Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
 420 425 430
 Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
 435 440 445
 Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
 450 455 460
 Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
 465 470 475 480
 Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
 485 490 495
 Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
 500 505 510
 Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu

ES 2 455 544 T3

515					520					525					
Pro	Phe	Leu	Val	Val	Ala	Gly	Ala	Tyr	Leu	Ala	Lys	Val	Asp	Ala	Tyr
530						535					540				
Glu	His	Ala	Thr	Thr	Val	Pro	Asn	Val	Pro	Gln	Ile	Pro	Tyr	Lys	Ala
545					550					555					560
Leu	Val	Glu	Arg	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro	Leu	Asn	Leu	Glu	Ile	Thr	Val
				565					570					575	
Met	Ser	Ser	Glu	Val	Leu	Pro	Ser	Thr	Asn	Gln	Glu	Tyr	Ile	Thr	Cys
			580					585					590		
Lys	Phe	Thr	Thr	Val	Val	Pro	Ser	Pro	Lys	Ile	Lys	Cys	Cys	Gly	Ser
		595					600					605			
Leu	Glu	Cys	Gln	Pro	Ala	Ala	His	Ala	Asp	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val	Phe
	610					615					620				
Gly	Gly	Val	Tyr	Pro	Phe	Met	Trp	Gly	Gly	Ala	Gln	Cys	Phe	Cys	Asp
625					630					635					640
Ser	Glu	Asn	Ser	Gln	Met	Ser	Glu	Ala	Tyr	Val	Glu	Leu	Ser	Ala	Asp
				645					650					655	
Cys	Ala	Ser	Asp	His	Ala	Gln	Ala	Ile	Lys	Val	His	Thr	Ala	Ala	Met
			660					665					670		
Lys	Val	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	Tyr	Gly	Asn	Thr	Thr	Ser	Phe	Leu	Asp
		675					680					685			
Val	Tyr	Val	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Lys	Asp	Leu	Lys	Val
	690					695					700				
Ile	Ala	Gly	Pro	Ile	Ser	Ala	Ser	Phe	Thr	Pro	Phe	Asp	His	Lys	Val
705					710					715					720
Val	Ile	His	Arg	Gly	Leu	Val	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Phe	Pro	Glu	Tyr	Gly
				725					730					735	
Ala	Met	Lys	Pro	Gly	Ala	Phe	Gly	Asp	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Thr
			740					745					750		
Ser	Lys	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser	Thr	Asp	Ile	Arg	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser
		755					760					765			
Ala	Lys	Asn	Val	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Gln	Ala	Ser	Ser	Gly	Phe	Glu
	770					775					780				

ES 2 455 544 T3

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785 790 795 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
805 810 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
820 825 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
835 840 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
850 855 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865 870 875 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
885 890 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
900 905 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
915 920 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
930 935 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945 950 955 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 5
<211> 980
<212> PRT
<213> Virus Sindbis

<400> 5

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

ES 2 455 544 T3

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Thr
210 215 220

Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr Thr
225 230 235 240

Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro Ser
245 250 255

Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr Gly
260 265 270

Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys Gln

ES 2 455 544 T3

275	280	285
Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser Pro		
290	295	300
Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His Leu		
305	310	315 320
Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His Ala		
	325	330 335
Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp Thr		
	340	345 350
Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro Glu		
	355	360 365
Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr Val		
	370	375 380
Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val Arg		
385	390	395 400
Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro His		
	405	410 415
Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile Leu		
	420	425 430
Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val Ala		
	435	440 445
Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr Ala		
	450	455 460
Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys Cys		
465	470	475 480
Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr Leu		
	485	490 495
Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro Leu		
	500	505 510
Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro Phe		
	515	520 525
Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu His		
	530	535 540

ES 2 455 544 T3

Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu Val
545 550 555 560

Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met Ser
565 570 575

Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys Phe
580 585 590

Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu Glu
595 600 605

Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly Gly
610 615 620

Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser Glu
625 630 635 640

Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys Ala
645 650 655

Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys Val
660 665 670

Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val Tyr
675 680 685

Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile Ala
690 695 700

Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val Ile
705 710 715 720

His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala Met
725 730 735

Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser Lys
740 745 750

Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala Lys
755 760 765

Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met Trp
770 775 780

Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly Cys
785 790 795 800

ES 2 455 544 T3

Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly Asn
805 810 815

Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr Ser
820 825 830

Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys Thr
835 840 845

Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser Asp
850 855 860

Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr Leu
865 870 875 880

Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val His
885 890 895

Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys Gly
900 905 910

Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His Ile
915 920 925

Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile Ser
930 935 940

Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser Ser
945 950 955 960

Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu Thr
965 970 975

Ser Thr Arg Arg
980

<210> 6
<211> 981
<212> PRT
<213> Virus Sindbis

<400> 6

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp

ES 2 455 544 T3

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

ES 2 455 544 T3

Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His
 305 310 315 320
 Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His
 325 330 335
 Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
 340 345 350
 Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
 355 360 365
 Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
 370 375 380
 Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
 385 390 395 400
 Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
 405 410 415
 His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
 420 425 430
 Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
 435 440 445
 Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
 450 455 460
 Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
 465 470 475 480
 Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr
 485 490 495
 Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro
 500 505 510
 Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro
 515 520 525
 Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu
 530 535 540
 His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu
 545 550 555 560

ES 2 455 544 T3

Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met
565 570 575

Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys
580 585 590

Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu
595 600 605

Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly
610 615 620

Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser
625 630 635 640

Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys
645 650 655

Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys
660 665 670

Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val
675 680 685

Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile
690 695 700

Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val
705 710 715 720

Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala
725 730 735

Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser
740 745 750

Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala
755 760 765

Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met
770 775 780

Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly
785 790 795 800

Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly
805 810 815

ES 2 455 544 T3

Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr
820 825 830

Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys
835 840 845

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser
850 855 860

Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr
865 870 875 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
885 890 895

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
900 905 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
915 920 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
930 935 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945 950 955 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 7
<211> 982
<212> PRT
<213> Virus Sindbis

<400> 7

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

ES 2 455 544 T3

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu
210 215 220

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
225 230 235 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
245 250 255

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
260 265 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
275 280 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
290 295 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
305 310 315 320

ES 2 455 544 T3

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
325 330 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
340 345 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
355 360 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
370 375 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
385 390 395 400

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
405 410 415

Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
420 425 430

Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
435 440 445

Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
450 455 460

Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
465 470 475 480

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
485 490 495

Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
500 505 510

Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
515 520 525

Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
530 535 540

Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
545 550 555 560

Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
565 570 575

ES 2 455 544 T3

Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
580 585 590

Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
595 600 605

Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
610 615 620

Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
625 630 635 640

Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
645 650 655

Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
660 665 670

Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
675 680 685

Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
690 695 700

Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
705 710 715 720

Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
725 730 735

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
740 745 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
755 760 765

Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
770 775 780

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785 790 795 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
805 810 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
820 825 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu

ES 2 455 544 T3

835 840 845
 Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
 850 855 860
 Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
 865 870 875 880
 Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
 885 890 895
 Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
 900 905 910
 Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
 915 920 925
 His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
 930 935 940
 Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
 945 950 955 960
 Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
 965 970 975
 Leu Thr Ser Thr Arg Arg
 980
 <210> 8
 <211> 981
 <212> PRT
 <213> Virus Sindbis
 <400> 8
 Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
 1 5 10 15
 Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
 20 25 30
 Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
 35 40 45
 Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
 50 55 60
 Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
 65 70 75 80

ES 2 455 544 T3

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu
210 215 220

Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr
225 230 235 240

Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro
245 250 255

Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr
260 265 270

Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys
275 280 285

Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser
290 295 300

Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His
305 310 315 320

Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His
325 330 335

ES 2 455 544 T3

Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
340 345 350

Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
355 360 365

Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
370 375 380

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
385 390 395 400

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
405 410 415

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
420 425 430

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
435 440 445

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
450 455 460

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
465 470 475 480

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr
485 490 495

Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro
500 505 510

Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro
515 520 525

Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu
530 535 540

His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu
545 550 555 560

Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met
565 570 575

Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys
580 585 590

Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu

ES 2 455 544 T3

595					600					605					
Glu	Cys	Gln	Pro	Ala	Ala	His	Ala	Asp	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val	Phe	Gly
610						615					620				
Gly	Val	Tyr	Pro	Phe	Met	Trp	Gly	Gly	Ala	Gln	Cys	Phe	Cys	Asp	Ser
625					630					635					640
Glu	Asn	Ser	Gln	Met	Ser	Glu	Ala	Tyr	Val	Glu	Leu	Ser	Ala	Asp	Cys
				645					650					655	
Ala	Ser	Asp	His	Ala	Gln	Ala	Ile	Lys	Val	His	Thr	Ala	Ala	Met	Lys
			660					665					670		
Val	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	Tyr	Gly	Asn	Thr	Thr	Ser	Phe	Leu	Asp	Val
		675					680					685			
Tyr	Val	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Lys	Asp	Leu	Lys	Val	Ile
	690					695					700				
Ala	Gly	Pro	Ile	Ser	Ala	Ser	Phe	Thr	Pro	Phe	Asp	His	Lys	Val	Val
705					710					715					720
Ile	His	Arg	Gly	Leu	Val	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Phe	Pro	Glu	Tyr	Gly	Ala
				725					730					735	
Met	Lys	Pro	Gly	Ala	Phe	Gly	Asp	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser
			740					745					750		
Lys	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser	Thr	Asp	Ile	Arg	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Ala
		755					760					765			
Lys	Asn	Val	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Gln	Ala	Ser	Ser	Gly	Phe	Glu	Met
	770					775					780				
Trp	Lys	Asn	Asn	Ser	Gly	Arg	Pro	Leu	Gln	Glu	Thr	Ala	Pro	Phe	Gly
785					790					795					800
Cys	Lys	Ile	Ala	Val	Asn	Pro	Leu	Arg	Ala	Val	Asp	Cys	Ser	Tyr	Gly
				805					810					815	
Asn	Ile	Pro	Ile	Ser	Ile	Asp	Ile	Pro	Asn	Ala	Ala	Phe	Ile	Arg	Thr
			820					825					830		
Ser	Asp	Ala	Pro	Leu	Val	Ser	Thr	Val	Lys	Cys	Glu	Val	Ser	Glu	Cys
		835					840					845			
Thr	Tyr	Ser	Ala	Asp	Phe	Gly	Gly	Met	Ala	Thr	Leu	Gln	Tyr	Val	Ser
	850					855					860				

ES 2 455 544 T3

Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr
865 870 875 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
885 890 895

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
900 905 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
915 920 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
930 935 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945 950 955 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 9
<211> 982
<212> PRT
<213> virus Sindbis

<400> 9

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

ES 2 455 544 T3

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu
210 215 220

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
225 230 235 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
245 250 255

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
260 265 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
275 280 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
290 295 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
305 310 315 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
325 330 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
340 345 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn

ES 2 455 544 T3

355		360		365
Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe	370	375	380	
Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro	385	390	395	400
Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp	405	410	415	
Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr	420	425	430	
Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr	435	440	445	
Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro	450	455	460	
Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu	465	470	475	480
Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser	485	490	495	
Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile	500	505	510	
Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu	515	520	525	
Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr	530	535	540	
Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala	545	550	555	560
Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val	565	570	575	
Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys	580	585	590	
Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser	595	600	605	
Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe	610	615	620	

ES 2 455 544 T3

Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
625 630 635 640

Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
645 650 655

Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
660 665 670

Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
675 680 685

Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
690 695 700

Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
705 710 715 720

Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
725 730 735

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
740 745 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
755 760 765

Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
770 775 780

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785 790 795 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
805 810 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
820 825 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
835 840 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
850 855 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865 870 875 880

ES 2 455 544 T3

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
885 890 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
900 905 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
915 920 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
930 935 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945 950 955 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 10
<211> 981
<212> PRT
<213> virus Sindbis

<400> 10

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys

ES 2 455 544 T3

115							120							125	
Tyr	Arg	Tyr	Met	Ser	Leu	Lys	Gln	Asp	His	Thr	Val	Glu	Glu	Gly	Thr
	130					135					140				
Met	Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser
145					150					155					160
Tyr	Lys	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Val
				165					170					175	
Thr	Val	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Cys	Thr	Leu	Ala
			180					185					190		
Arg	Lys	Ile	Lys	Pro	Lys	Phe	Val	Gly	Arg	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu	Pro
		195					200					205			
Pro	Val	His	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Asp	Arg	Leu	Glu
	210					215					220				
Thr	Thr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Thr	Met	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Ala	Tyr
225					230					235					240
Thr	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Tyr	Ala	Lys	Pro	Pro
				245					250					255	
Ser	Gly	Lys	Asn	Ile	Thr	Tyr	Glu	Cys	Lys	Cys	Gly	Asp	Tyr	Lys	Thr
			260					265					270		
Gly	Thr	Val	Ser	Thr	Arg	Thr	Glu	Ile	Thr	Gly	Cys	Thr	Ala	Ile	Lys
		275					280					285			
Gln	Cys	Val	Ala	Tyr	Lys	Ser	Asp	Gln	Thr	Lys	Trp	Val	Phe	Asn	Ser
	290					295					300				
Pro	Asp	Leu	Ile	Arg	His	Asp	Asp	His	Thr	Ala	Gln	Gly	Lys	Leu	His
305					310					315					320
Leu	Pro	Phe	Lys	Leu	Ile	Pro	Ser	Thr	Cys	Met	Val	Pro	Val	Ala	His
				325					330					335	
Ala	Pro	Asn	Val	Ile	His	Gly	Phe	Lys	His	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu	Asp
			340					345					350		
Thr	Asp	His	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Thr	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Asn	Pro
		355					360					365			
Glu	Pro	Thr	Thr	Glu	Trp	Ile	Val	Gly	Lys	Thr	Val	Arg	Asn	Phe	Thr
	370					375					380				

ES 2 455 544 T3

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
385 390 395 400

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
405 410 415

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
420 425 430

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
435 440 445

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
450 455 460

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
465 470 475 480

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr
485 490 495

Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro
500 505 510

Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro
515 520 525

Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu
530 535 540

His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu
545 550 555 560

Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met
565 570 575

Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys
580 585 590

Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu
595 600 605

Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly
610 615 620

Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser
625 630 635 640

ES 2 455 544 T3

Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys
645 650 655

Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys
660 665 670

Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val
675 680 685

Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile
690 695 700

Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val
705 710 715 720

Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala
725 730 735

Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser
740 745 750

Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala
755 760 765

Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met
770 775 780

Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly
785 790 795 800

Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly
805 810 815

Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr
820 825 830

Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys
835 840 845

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser
850 855 860

Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr
865 870 875 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
885 890 895

ES 2 455 544 T3

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
900 905 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
915 920 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
930 935 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945 950 955 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 11
<211> 982
<212> PRT
<213> virus Sindbis

<400> 11

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
130 135 140

ES 2 455 544 T3

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
210 215 220

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
225 230 235 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
245 250 255

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
260 265 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
275 280 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
290 295 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
305 310 315 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
325 330 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
340 345 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
355 360 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
370 375 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
385 390 395 400

ES 2 455 544 T3

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
 405 410 415
 Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
 420 425 430
 Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
 435 440 445
 Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
 450 455 460
 Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
 465 470 475 480
 Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
 485 490 495
 Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
 500 505 510
 Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
 515 520 525
 Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
 530 535 540
 Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
 545 550 555 560
 Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
 565 570 575
 Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
 580 585 590
 Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
 595 600 605
 Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
 610 615 620
 Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
 625 630 635 640
 Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
 645 650 655

ES 2 455 544 T3

Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
660 665 670

Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
675 680 685

Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
690 695 700

Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
705 710 715 720

Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
725 730 735

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
740 745 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
755 760 765

Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
770 775 780

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785 790 795 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
805 810 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
820 825 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
835 840 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
850 855 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865 870 875 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
885 890 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
900 905 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp

ES 2 455 544 T3

915		920		925
His Ile Val Ser Thr Pro	His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala			
930	935	940		
Ile Ser Lys Thr Ser Trp	Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala			
945	950	955		960
Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met				
	965	970		975
Leu Thr Ser Thr Arg Arg				
	980			
<210> 12				
<211> 981				
<212> PRT				
<213> virus Sindbis				
<400> 12				
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val				
1	5	10		15
Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser				
	20	25		30
Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp				
	35	40		45
Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys				
	50	55		60
Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr				
65	70	75		80
Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile				
	85	90		95
Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr				
	100	105		110
Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys				
	115	120		125
Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr				
	130	135		140
Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser				
145	150	155		160

ES 2 455 544 T3

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

ES 2 455 544 T3

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

ES 2 455 544 T3

675					680					685					
Tyr	Val	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Lys	Asp	Leu	Lys	Val	Ile
690						695					700				
Ala	Gly	Pro	Ile	Ser	Ala	Ser	Phe	Thr	Pro	Phe	Asp	His	Lys	Val	Val
705					710					715					720
Ile	His	Arg	Gly	Leu	Val	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Phe	Pro	Glu	Tyr	Gly	Ala
				725					730					735	
Met	Lys	Pro	Gly	Ala	Phe	Gly	Asp	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser
			740					745					750		
Lys	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser	Thr	Asp	Ile	Arg	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Ala
		755					760					765			
Lys	Asn	Val	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Gln	Ala	Ser	Ser	Gly	Phe	Glu	Met
	770					775					780				
Trp	Lys	Asn	Asn	Ser	Gly	Arg	Pro	Leu	Gln	Glu	Thr	Ala	Pro	Phe	Gly
785					790					795					800
Cys	Lys	Ile	Ala	Val	Asn	Pro	Leu	Arg	Ala	Val	Asp	Cys	Ser	Tyr	Gly
				805					810					815	
Asn	Ile	Pro	Ile	Ser	Ile	Asp	Ile	Pro	Asn	Ala	Ala	Phe	Ile	Arg	Thr
			820					825					830		
Ser	Asp	Ala	Pro	Leu	Val	Ser	Thr	Val	Lys	Cys	Glu	Val	Ser	Glu	Cys
		835					840					845			
Thr	Tyr	Ser	Ala	Asp	Phe	Gly	Gly	Met	Ala	Thr	Leu	Gln	Tyr	Val	Ser
	850					855					860				
Asp	Arg	Glu	Gly	Gln	Cys	Pro	Val	His	Ser	His	Ser	Ser	Thr	Ala	Thr
865					870					875					880
Leu	Gln	Glu	Ser	Thr	Val	His	Val	Leu	Glu	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Val
				885					890					895	
His	Phe	Ser	Thr	Ala	Ser	Pro	Gln	Ala	Asn	Phe	Ile	Val	Ser	Leu	Cys
			900					905					910		
Gly	Lys	Lys	Thr	Thr	Cys	Asn	Ala	Glu	Cys	Lys	Pro	Pro	Ala	Asp	His
		915					920					925			
Ile	Val	Ser	Thr	Pro	His	Lys	Asn	Asp	Gln	Glu	Phe	Gln	Ala	Ala	Ile
	930					935					940				

ES 2 455 544 T3

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945 950 955 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 13
<211> 982
<212> PRT
<213> virus Sindbis

<400> 13

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

ES 2 455 544 T3

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190
 Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
 195 200 205
 Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
 210 215 220
 Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
 225 230 235 240
 Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
 245 250 255
 Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
 275 280 285
 Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
 290 295 300
 Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
 305 310 315 320
 His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
 325 330 335
 His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
 340 345 350
 Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
 355 360 365
 Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
 370 375 380
 Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
 385 390 395 400
 Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
 405 410 415
 Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
 420 425 430
 Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr

ES 2 455 544 T3

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

Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
 705 710 715 720
 Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
 725 730 735
 Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
 740 745 750
 Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
 755 760 765
 Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
 770 775 780
 Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
 785 790 795 800
 Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
 805 810 815
 Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
 820 825 830
 Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
 835 840 845
 Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
 850 855 860
 Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
 865 870 875 880
 Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
 885 890 895
 Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
 900 905 910
 Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
 915 920 925
 His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
 930 935 940
 Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
 945 950 955 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
 965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
 980

<210> 14
 <211> 981
 <212> PRT
 <213> virus Sindbis

<400> 14

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
 1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
 20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
 35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
 50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
 65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
 85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
 100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
 130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
 145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro

ES 2 455 544 T3

195	200	205
Pro Val His Gly Lys Lys Ile	Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys	
210	215	220
Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg	Pro Arg Pro His Ala Tyr	
225	230	235
Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro		
	245	250
Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr		
	260	265
Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys		
	275	280
Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser		
	290	300
Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His		
305	310	315
Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His		
	325	330
Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp		
	340	345
Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro		
	355	360
Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr		
	370	375
Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val		
385	390	395
Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro		
	405	410
His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile		
	420	425
Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val		
	435	440
Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr		
450	455	460

ES 2 455 544 T3

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
465 470 475 480

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr
485 490 495

Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro
500 505 510

Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro
515 520 525

Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu
530 535 540

His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu
545 550 555 560

Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met
565 570 575

Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys
580 585 590

Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu
595 600 605

Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly
610 615 620

Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser
625 630 635 640

Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys
645 650 655

Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys
660 665 670

Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val
675 680 685

Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile
690 695 700

Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val
705 710 715 720

ES 2 455 544 T3

Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala
725 730 735

Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser
740 745 750

Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala
755 760 765

Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met
770 775 780

Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly
785 790 795 800

Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly
805 810 815

Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr
820 825 830

Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys
835 840 845

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser
850 855 860

Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr
865 870 875 880

Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr Val
885 890 895

His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu Cys
900 905 910

Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
915 920 925

Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
930 935 940

Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945 950 955 960

Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 15
<211> 982
<212> PRT
<213> virus Sindbis

<400> 15

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
210 215 220

ES 2 455 544 T3

Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
225 230 235 240

Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
245 250 255

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
260 265 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
275 280 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
290 295 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
305 310 315 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
325 330 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
340 345 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
355 360 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
370 375 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
385 390 395 400

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
405 410 415

Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
420 425 430

Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
435 440 445

Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
450 455 460

Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
465 470 475 480

ES 2 455 544 T3

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
 485 490 495
 Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
 500 505 510
 Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
 515 520 525
 Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
 530 535 540
 Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
 545 550 555 560
 Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
 565 570 575
 Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
 580 585 590
 Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
 595 600 605
 Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
 610 615 620
 Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
 625 630 635 640
 Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
 645 650 655
 Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
 660 665 670
 Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
 675 680 685
 Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
 690 695 700
 Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
 705 710 715 720
 Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
 725 730 735

ES 2 455 544 T3

Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
740 745 750

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
755 760 765

Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
770 775 780

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785 790 795 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
805 810 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
820 825 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
835 840 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
850 855 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865 870 875 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
885 890 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
900 905 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
915 920 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
930 935 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945 950 955 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 16

ES 2 455 544 T3

<211> 981
 <212> PRT
 <213> virus Sindbis

<400> 16

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
 1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
 20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
 35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
 50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
 65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
 85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
 100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
 130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
 145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
 195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
 210 215 220

Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr
 225 230 235 240

ES 2 455 544 T3

Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro
245 250 255

Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr
260 265 270

Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile Lys
275 280 285

Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser
290 295 300

Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His
305 310 315 320

Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His
325 330 335

Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp
340 345 350

Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
355 360 365

Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
370 375 380

Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
385 390 395 400

Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
405 410 415

His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
420 425 430

Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
435 440 445

Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
450 455 460

Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
465 470 475 480

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr
485 490 495

ES 2 455 544 T3

Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro
 500 505 510
 Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro
 515 520 525
 Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr Glu
 530 535 540
 His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu
 545 550 555 560
 Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met
 565 570 575
 Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys
 580 585 590
 Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu
 595 600 605
 Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly
 610 615 620
 Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser
 625 630 635 640
 Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys
 645 650 655
 Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys
 660 665 670
 Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val
 675 680 685
 Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile
 690 695 700
 Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val
 705 710 715 720
 Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala
 725 730 735
 Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser
 740 745 750
 Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala

ES 2 455 544 T3

755					760					765					
Lys	Asn	Val	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Gln	Ala	Ser	Ser	Gly	Phe	Glu	Met
770						775					780				
Trp	Lys	Asn	Asn	Ser	Gly	Arg	Pro	Leu	Gln	Glu	Thr	Ala	Pro	Phe	Gly
785					790					795					800
Cys	Lys	Ile	Ala	Val	Asn	Pro	Leu	Arg	Ala	Val	Asp	Cys	Ser	Tyr	Gly
				805					810					815	
Asn	Ile	Pro	Ile	Ser	Ile	Asp	Ile	Pro	Asn	Ala	Ala	Phe	Ile	Arg	Thr
			820					825					830		
Ser	Asp	Ala	Pro	Leu	Val	Ser	Thr	Val	Lys	Cys	Glu	Val	Ser	Glu	Cys
		835					840					845			
Thr	Tyr	Ser	Ala	Asp	Phe	Gly	Gly	Met	Ala	Thr	Leu	Gln	Tyr	Val	Ser
	850					855					860				
Asp	Arg	Glu	Gly	Gln	Cys	Pro	Val	His	Ser	His	Ser	Ser	Thr	Ala	Thr
865					870					875					880
Leu	Gln	Glu	Ser	Thr	Val	His	Val	Leu	Glu	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Val
				885					890					895	
His	Phe	Ser	Thr	Ala	Ser	Pro	Gln	Ala	Asn	Phe	Ile	Val	Ser	Leu	Cys
			900					905					910		
Gly	Lys	Lys	Thr	Thr	Cys	Asn	Ala	Glu	Cys	Lys	Pro	Pro	Ala	Asp	His
		915					920					925			
Ile	Val	Ser	Thr	Pro	His	Lys	Asn	Asp	Gln	Glu	Phe	Gln	Ala	Ala	Ile
	930					935					940				
Ser	Lys	Thr	Ser	Trp	Ser	Trp	Leu	Phe	Ala	Leu	Phe	Gly	Gly	Ala	Ser
945					950					955					960
Ser	Leu	Leu	Ile	Ile	Gly	Leu	Met	Ile	Phe	Ala	Cys	Ser	Met	Met	Leu
				965					970					975	
Thr	Ser	Thr	Arg	Arg											
			980												

<210> 17
 <211> 982
 <212> PRT
 <213> virus Sindbis
 <400> 17

ES 2 455 544 T3

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

ES 2 455 544 T3

Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
260 265 270

Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
275 280 285

Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
290 295 300

Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
305 310 315 320

His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
325 330 335

His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
340 345 350

Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
355 360 365

Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
370 375 380

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
385 390 395 400

Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
405 410 415

Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
420 425 430

Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
435 440 445

Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
450 455 460

Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
465 470 475 480

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
485 490 495

Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
500 505 510

Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu

ES 2 455 544 T3

515	520	525
Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr 530 535 540		
Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala 545 550 555 560		
Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val 565 570 575		
Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys 580 585 590		
Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser 595 600 605		
Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe 610 615 620		
Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp 625 630 635 640		
Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp 645 650 655		
Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met 660 665 670		
Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp 675 680 685		
Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val 690 695 700		
Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val 705 710 715 720		
Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly 725 730 735		
Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr 740 745 750		
Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser 755 760 765		
Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu 770 775 780		

ES 2 455 544 T3

Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
785 790 795 800

Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
805 810 815

Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
820 825 830

Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
835 840 845

Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
850 855 860

Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
865 870 875 880

Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
885 890 895

Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
900 905 910

Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
915 920 925

His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
930 935 940

Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
945 950 955 960

Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
965 970 975

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 18
<211> 423
<212> PRT
<213> virus Sindbis

<400> 18

Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr Cys
1 5 10 15

ES 2 455 544 T3

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

ES 2 455 544 T3

275 280 285
 Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro
 290 295 300
 Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr
 305 310 315 320
 Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val
 325 330 335
 Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro
 340 345 350
 His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile
 355 360 365
 Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val
 370 375 380
 Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr
 385 390 395 400
 Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys
 405 410 415
 Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
 420

<210> 19
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> virus Sindbis

<400> 19

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
 1 5 10 15
 Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
 20 25 30
 Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
 35 40 45
 Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
 50 55 60

Arg
 65

ES 2 455 544 T3

<210> 20
 <211> 488
 <212> PRT
 <213> virus Sindbis

<400> 20

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
 1 5 10 15

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
 20 25 30

Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
 35 40 45

Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
 50 55 60

Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
 65 70 75 80

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
 85 90 95

Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
 100 105 110

Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
 115 120 125

Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
 130 135 140

Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
 145 150 155 160

Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190

Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
 195 200 205

Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
 210 215 220

Glu Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala

ES 2 455 544 T3

225 230 235 240
 Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
 245 250 255
 Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
 275 280 285
 Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
 290 295 300
 Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
 305 310 315 320
 His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala
 325 330 335
 His Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu
 340 345 350
 Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn
 355 360 365
 Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe
 370 375 380
 Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
 385 390 395 400
 Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
 405 410 415
 Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
 420 425 430
 Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
 435 440 445
 Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
 450 455 460
 Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
 465 470 475 480
 Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
 485

<210> 21
 <211> 683
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 21
 cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60
 ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120
 aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaaag aaaagggggg 180
 actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatatc cttgatctgt ggatctacca 240
 cacacaaggc tacttccctg attggcagaa ctacacacca gggccaggga tcagatatcc 300
 actgaccttt ggatgggtgt acaagctagt accagttgag caagagaagg tagaagaagc 360
 caatgaagga gagaacaccc gcttggttaca cctgtgagc ctgcatggga tggatgacct 420
 ggagagagaa gtattagagt ggagggttga cagccgccta gcatttcata acatggcccc 480
 agagctgcat ccggactgta ctgggtctct ctgggttagac cagatctgag cctgggagct 540
 ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgctt gagtgcttca 600
 agtagtgtgt gcccgctctgt tgtgtgactc tggtaactag agatccctca gaccctttta 660
 gtcagtgtgg aaaatctcta gca 683

<210> 22
 <211> 416
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 22
 cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60
 ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120
 aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaaag aaaagggggg 180
 actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatctg ctttttgctt gtactgggtc 240
 tctctgggta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct 300
 taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgt tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360
 ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagca 416

<210> 23
 <211> 401
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 23
 cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60
 ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120
 aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttactgg aagggtctaat 180

tcactcccaa cgaagacaag atctgctttt tgcctgtact gggctctctt ggtagacca 240
gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaacca ctgcttaagc ctcaataaag 300
cttgccctga gtgcttcaag tagtggtggt ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag 360
atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa aatctctagc a 401

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> Gallus gallus

<400> 24

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 25

Ser Pro Ser Tyr Ala Tyr His Gln Phe
1 5

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> virus Sindbis

<400> 26

Arg Ser Lys Arg Ser
1 5

<210> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> virus Sindbis

<400> 27

Arg Ser Lys Arg
1

REIVINDICACIONES

1. Una partícula de vector lentivírico que comprende:

(a) una envoltura que comprende:

(i) una glucoproteína E2 de virus Sindbis de la SEC ID N°: 1 en que 160X está ausente o es un aminoácido distinto de ácido glutámico o una variante de la SEC ID N°: 1 del mismo que tiene al menos 80% de identidad para la SEC ID N°: 1 y en que 160X está ausente o es un aminoácido distinto de ácido glutámico, capaz de infectar células dendríticas; en la que E2 no es parte de una proteína de fusión con virus Sindbis E3 y

(b) un genoma de vector lentivírico que comprende una o más secuencias de interés.

2. La partícula de vector lentivírico según la reivindicación 1, en la que el 160X está ausente o es glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina, tal como seleccionada de glicina, valina, leucina o isoleucina.

3. La partícula de vector lentivírico según la reivindicación 1 ó 2, en la que la variante de la glucoproteína E2 tiene al menos un aminoácido modificado para reducir su carga positiva neta.

4. La partícula de vector lentivírico según la reivindicación 3, en la que al menos un aminoácido que se tiene que modificar para reducir la carga positiva neta se elige de: lisina 70, lisina 76 o lisina 159 de la SEC ID N°:1 y preferiblemente en la que las sustituciones se eligen independientemente de ácido glutámico o ácido aspártico.

5. La partícula de vector lentivírico según la reivindicación 1, en la que la secuencia de la variante de E2 son los restos de aminoácido 66 a 488 de la SEC ID N°: 3, los restos de aminoácido 66 a 488 de la SEC ID N°: 4 o los restos de aminoácido 66 a 486 de la SEC ID N°: 5 (variantes 1, 2 y 3).

6. La partícula de vector lentivírico según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, que es una variante en que la secuencia de los restos 71-75 de la SEC ID N°: 1 es igual o tiene una o dos sustituciones que no afectan a la capacidad de la variante para infectar las CD, pero no modifica el número de aminoácidos en esta región.

7. La partícula de vector lentivírico según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la secuencia de interés expresa un producto que es un antígeno de un agente causante de enfermedad o una célula enferma.

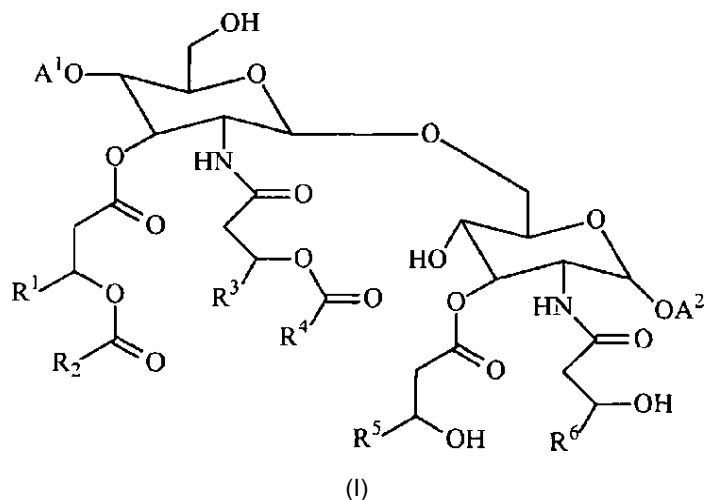
8. La partícula de vector lentivírico según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la secuencia de interés codifica un antígeno específico del tumor, opcionalmente NY-ESO-1, MAGE, MART-1/Melan-A, BAGE, RAGE, un antígeno de linaje de melanocito-melanoma, tal como gp100, gp75, mda-7, tirosinasa o proteína relacionada con tirosinasa; antígeno de carcinoma de células renales, 5T4, SM22-alfa, anhidrasa carbónica I, anhidrasa carbónica IX (también conocida como G250), factores inducibles por hipoxia (opcionalmente, HIF-1 alfa o HIF-2alfa), VEGF o antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), antígeno específico de la próstata (PSA), fosfatos ácidos prostáticos, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata (STEAP), NKX3.1, proteínas/péptidos de epítomos derivados de genes mutados en células tumorales o genes transcritos a diferentes niveles en el tumor comparado con células normales, tales como enzima telomerasa, survivina, mesotelina, ras mutado, reorganización de bcr/abl, Her2/neu, p53 mutado o de cepa natural, citocromo P450 1B1, secuencias de intrones expresadas anormalmente tales como N-acetilglucosaminiltransferasa-V; reordenaciones clónicas de genes de inmunoglobulina que generan idiotipos únicos en el mieloma o linfomas de células B; proteínas/péptidos de epítomos derivados de procedimientos oncovíricos, tales como proteínas del virus del papiloma humano E6 o E7 o proteínas oncofetales no mutadas con una expresión selectiva del tumor, tal como antígeno carcinoembrionario o alfa-fetoproteína.

9. La partícula de vector lentivírico según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, en la que la secuencia de interés codifica un antígeno derivado de virus, tal como un antígeno de VIH o VIS, polipéptidos de adenovirus, polipéptidos de alfavirus, polipéptidos de calicivirus, por ej., un antígeno de la cápside de calicivirus, polipéptidos de coronavirus, polipéptido de virus del distemper, polipéptido de virus de Ebola, polipéptido de enterovirus, polipéptido de flavivirus, polipéptido de virus de la hepatitis (AE), por ej., un antígeno del núcleo o de superficie de la hepatitis B o una glucoproteína E1 o E2 del virus de la hepatitis C, proteínas de núcleo o no estructurales, polipéptido de herpesvirus, por ej., una glucoproteína de virus de herpes simple o de virus de varicela zóster, polipéptido de virus de inmunodeficiencia, por ej., la envoltura o proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana, polipéptido de virus de peritonitis infecciosa, polipéptido de virus de la influenza, por ej., una hemaglutinina de la influenza A, neuraminidasa o nucleoproteína, polipéptido de virus de la leucemia, polipéptido de virus de Marburg, polipéptido de ortomixovirus, polipéptido de virus de papiloma, polipéptido de virus de parainfluenza, por ej., la hemaglutinina/neuraminidasa, polipéptido de paramixovirus, polipéptido de parvovirus, polipéptido de pestivirus, polipéptido de virus de picorna, por ej., un polipéptido de cápside de poliovirus, polipéptido de pox virus, por ej., un polipéptido de virus vaccinia, polipéptido del virus rabies, por ej., una glucoproteína G del virus rabies, polipéptido de reovirus, polipéptido de retrovirus o polipéptido de rotavirus.

10. Una composición que comprende una partícula de vector lentivírico según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, en la que la composición tiene una UI de al menos 10^5 /ml.

11. Un sistema de empaquetamiento de vector lentivírico para producir una partícula de vector lentivírico pseudotipificado según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la composición según la reivindicación 10, que comprende:
- 5 (i) una primera molécula de ácido nucleico que codifica la glucoproteína E2 del virus Sindbis según la reivindicación 1(a)(i) y
 - (ii) una segunda molécula de ácido nucleico que codifica proteínas gag y pol,
 - (iii) una tercera molécula de ácido nucleico que codifica rev;
 - (iv) un genoma de vector lentivírico que comprende una secuencia de interés y
 - (v) una célula de empaquetamiento.
- 10 12. El sistema de empaquetamiento de vector lentivírico según la reivindicación 11, en la que:
- (a) la proteína pol presenta una integrasa no funcional y/o
 - (b) la proteína pol presenta una integrasa no funcional con una mutación D64V y/o
 - (c) el genoma de vector lentivírico es un genoma lentivírico no integrante y/o
 - (d) la célula de empaquetamiento se transforma de manera estable con (ii) y (iii) y/o
 - 15 (e) la célula de empaquetamiento se transfecta con (i) y (iv).
13. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la glucoproteína E2 o variante según la reivindicación 1(a)(i) o una cualquiera de las reivindicaciones 2-9.
14. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 13, en la que la proteína es una poliproteína E3/E2/6K/E1 de Sindbis que se trata de manera que la proteína E2 no sea parte de una proteína de fusión con E3 cuando se incorpora a una envoltura vírica.
- 20 15. La molécula de ácido nucleico según la reivindicación 14, en la que la secuencia E3 corresponde a (a) restos 1-65 de la SEC ID N°: 20 o (b) una variante de la misma con al menos 80% de identidad de secuencia para los restos 1-65 de la SEC ID N°: 20, en la que los restos 62-65 son RSKR (SEC ID N°: 27) y la variante es capaz de incorporarse a una envoltura vírica pseudotipificada.
- 25 16. Un método para preparar una partícula de vector lentivírico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la composición según la reivindicación 10, que comprende cultivar la célula de empaquetamiento según la reivindicación 11.
17. La partícula lentivírica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la composición según la reivindicación 10, en la que el genoma del vector lentivírico:
- 30 (a) tiene una repetición terminal larga 3' (LTR) inactivada o auto-inactivada y/o
 - (b) comprende un elemento U3 que carece de al menos uno de: (i) una secuencia potenciadora; (ii) una caja TATA
 - (iii) un sitio Sp1 (iv) un sitio NK-kappa B y (v) un tramo de polipurina (PPT) y/o
 - (c) comprende la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 21, 22 ó 23 y/o
 - (d) comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un factor de maduración/estimulación de células
 - 35 dendríticas.
18. Una partícula de vector lentivírico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la composición según la reivindicación 10, para uso en un método de tratamiento de un individuo, ser humano o animal, que comprende opcionalmente suministrar partículas de vector lentivírico a células dendríticas ex vivo.
19. Una partícula de vector lentivírico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la composición según la reivindicación 10, para uso en la inducción de una respuesta inmunitaria específica del antígeno, opcionalmente una respuesta humoral y/o respuesta celular.
- 40 20. Una vacuna terapéutica o profiláctica que comprende las partículas de vector lentivírico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la composición según la reivindicación 10 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
21. La vacuna terapéutica o profiláctica según la reivindicación 20, que comprende además un adyuvante.
- 45 22. La vacuna terapéutica o profiláctica según la reivindicación 21, en la que el adyuvante es un adyuvante de la

fórmula (I):



5 en la que A1 y A2 se seleccionan independientemente del grupo de: hidrógeno, fosfato y sales de fosfato y los restos R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ se seleccionan independientemente del grupo de hidrocarbilo con 3 a 23 carbonos, representados por C₃-C₂₃.

23. La vacuna terapéutica o profiláctica según la reivindicación 22, en la que:

(a) A1 es fosfato o sal de fosfato y A2 es hidrógeno y

(b) (i) R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁-C₂₀ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₁₂-C₂₀ o

10 (ii) R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₁₃

o

(iii) R¹, R³, R⁵ y R⁶ son undecilo y R² y R⁴ son tridecilo.

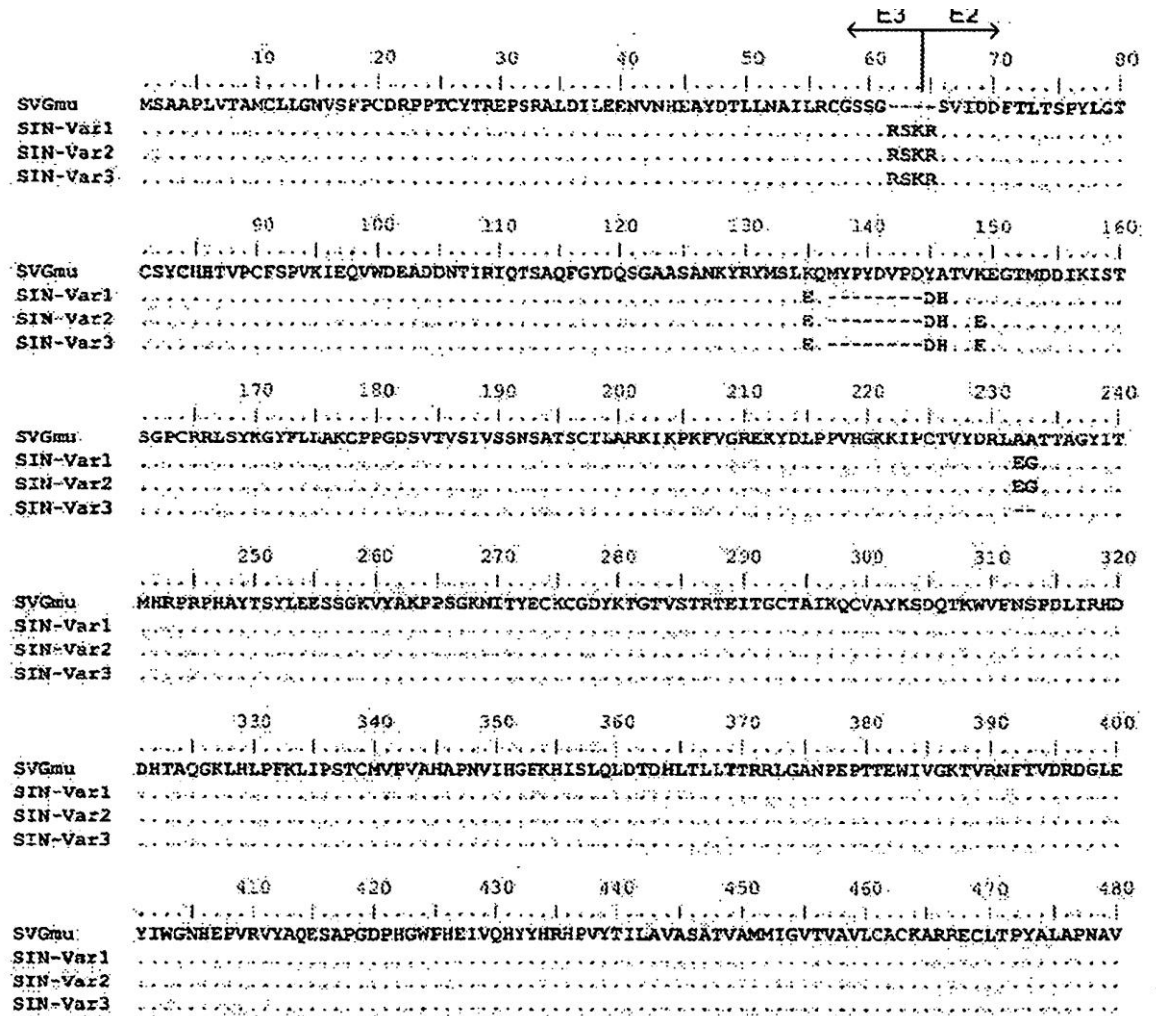


FIGURA 1A

E2 6K-E1
490 500 510 520 530 540 550 560

SVGmu IPTSLALLCCVRSANAETETETMSYLWSNSQPFVWQLCIPLAAFIVLNRCCSCCLPFLVVAGAYLAKVDAYENATTVPN
 SIN-Var1
 SIN-Var2
 SIN-Var3

570 580 590 600 610 620 630 640

SVGmu VPQIPYKALVERAGYAPLNLEITVMSSEVLPSTNQEYITCKETTVPSPRIKCCGSLECPAAHAGYTCCKVPGGVYPFMW
 SIN-Var1
 SIN-Var2
 SIN-Var3

650 660 670 680 690 700 710 720

SVGmu GGAQCTCDSENSQMSAYVELSADCASDHAQAIKVHTAAMKVGRLRVYGNITTSFLOVYVNGVTPGTSKDLKVIAGPISAS
 SIN-Var1
 SIN-Var2
 SIN-Var3

730 740 750 760 770 780 790 800

SVGmu FTFPDHKVVIHRLVNYDFPSYGAMKPGAFGDIQATSLTSKDLIASTDIRLLKPSAKNVHVPYTOASSGFEMWKNNSGR
 SIN-Var1
 SIN-Var2
 SIN-Var3

810 820 830 840 850 860 870 880

SVGmu PLQETAPFGCKIAVNPLRAVDCSYGNIPISIDIPNAAFIRTSDAFLVSTVKCEVSECTYSADFGGMATLQYVSDREGQCP
 SIN-Var1
 SIN-Var2
 SIN-Var3

890 900 910 920 930 940 950 960

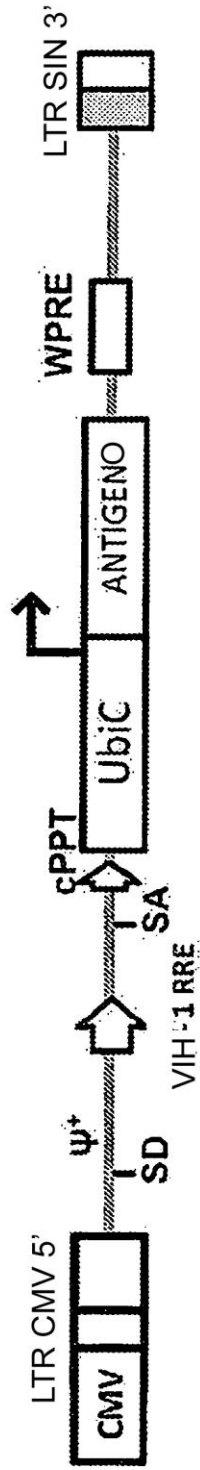
SVGmu VHSHSSTATIQESTVHVLEKGAVTVHFTASPOANFIVSLCGKKTTCNAECKPPADHIVSTPHKNDQEFQAAISKTSWSW
 SIN-Var1
 SIN-Var2
 SIN-Var3

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040

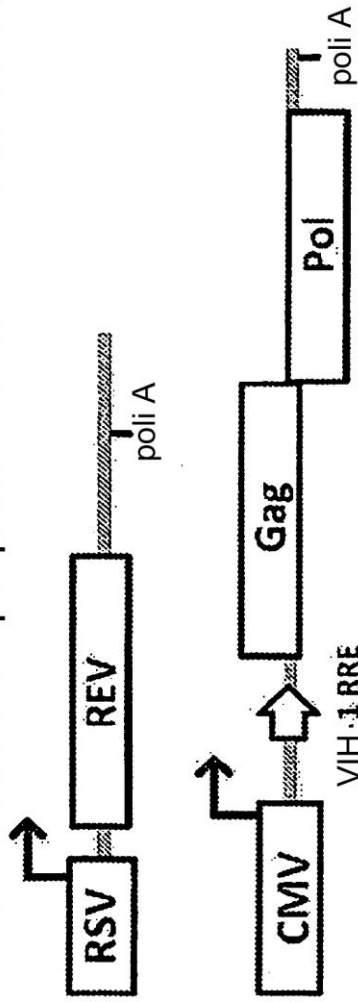
SVGmu LFALEGGASSLLIIGLMIFACSMMLYSTRR
 SIN-Var1
 SIN-Var2
 SIN-Var3

FIGURA 1B

Vector Auto-inactivante (SIN)



Plásmidos de empaquetamiento LV de tercera generación



Envoltura que fija como objetivo células dendríticas



FIGURA 2

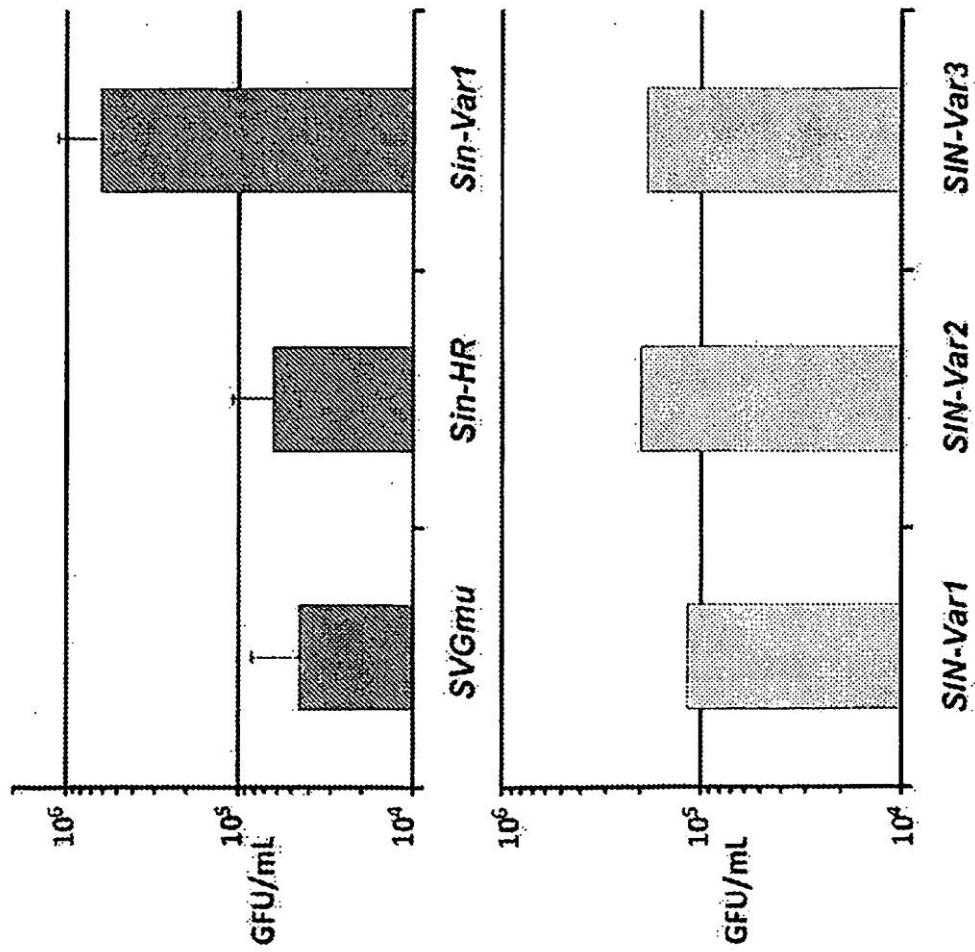


FIGURA 3

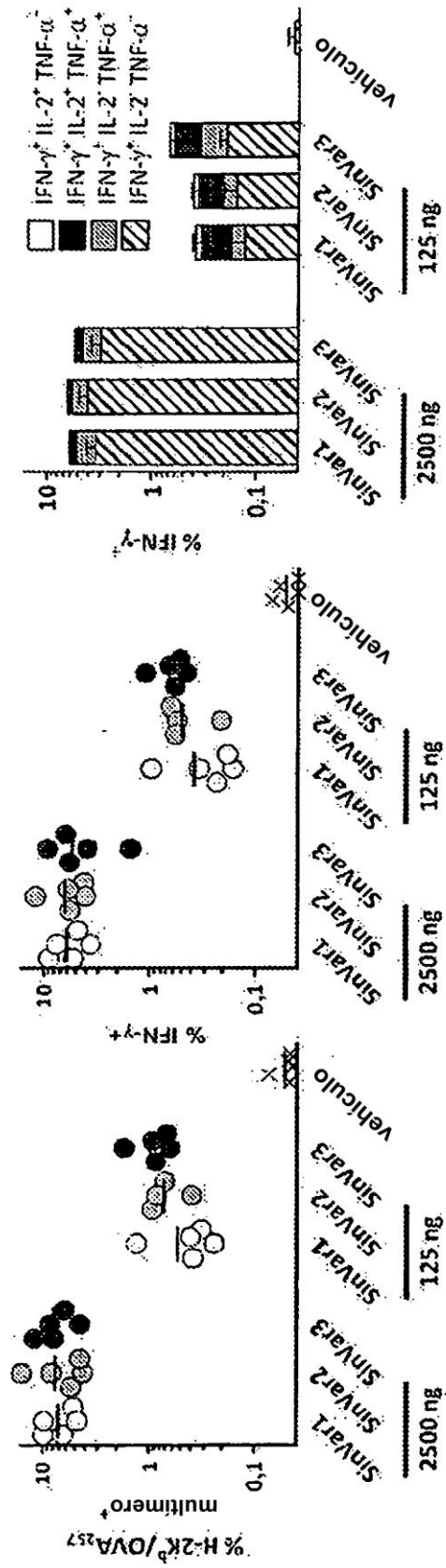


FIGURA 4A

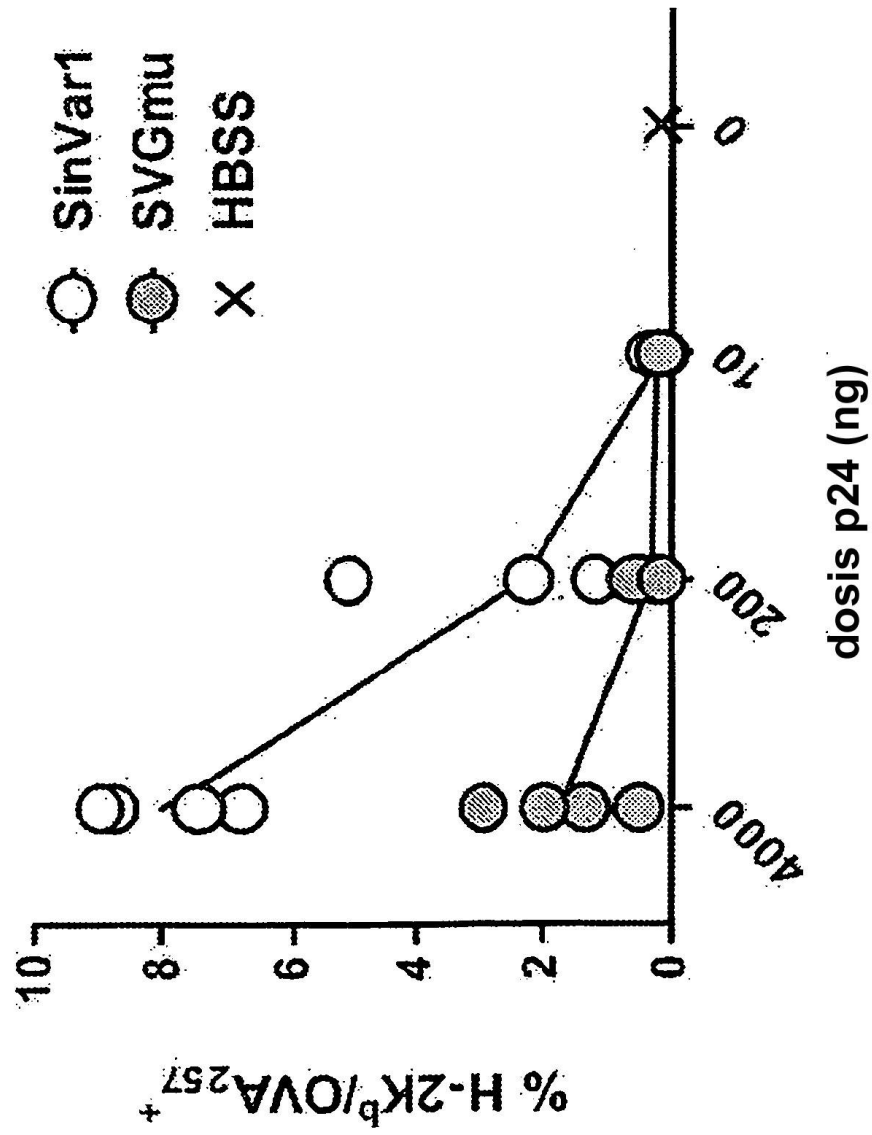


FIGURA 4B

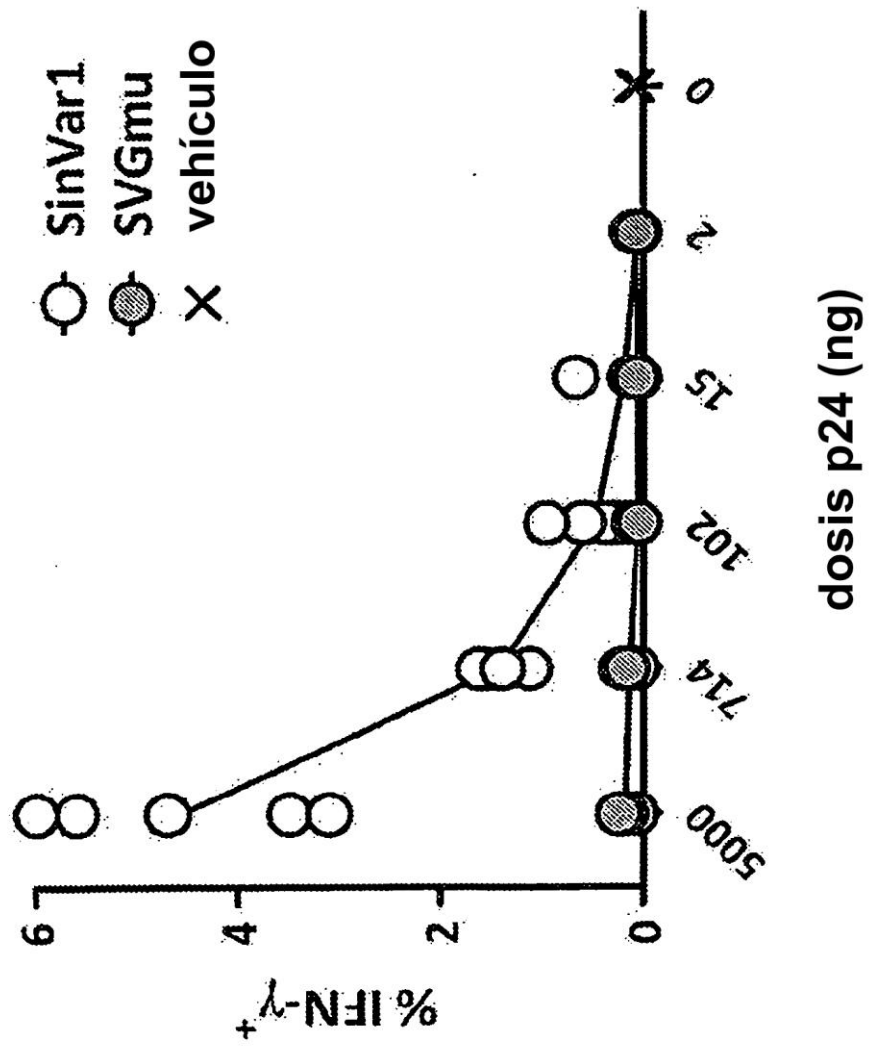


FIGURA 4C

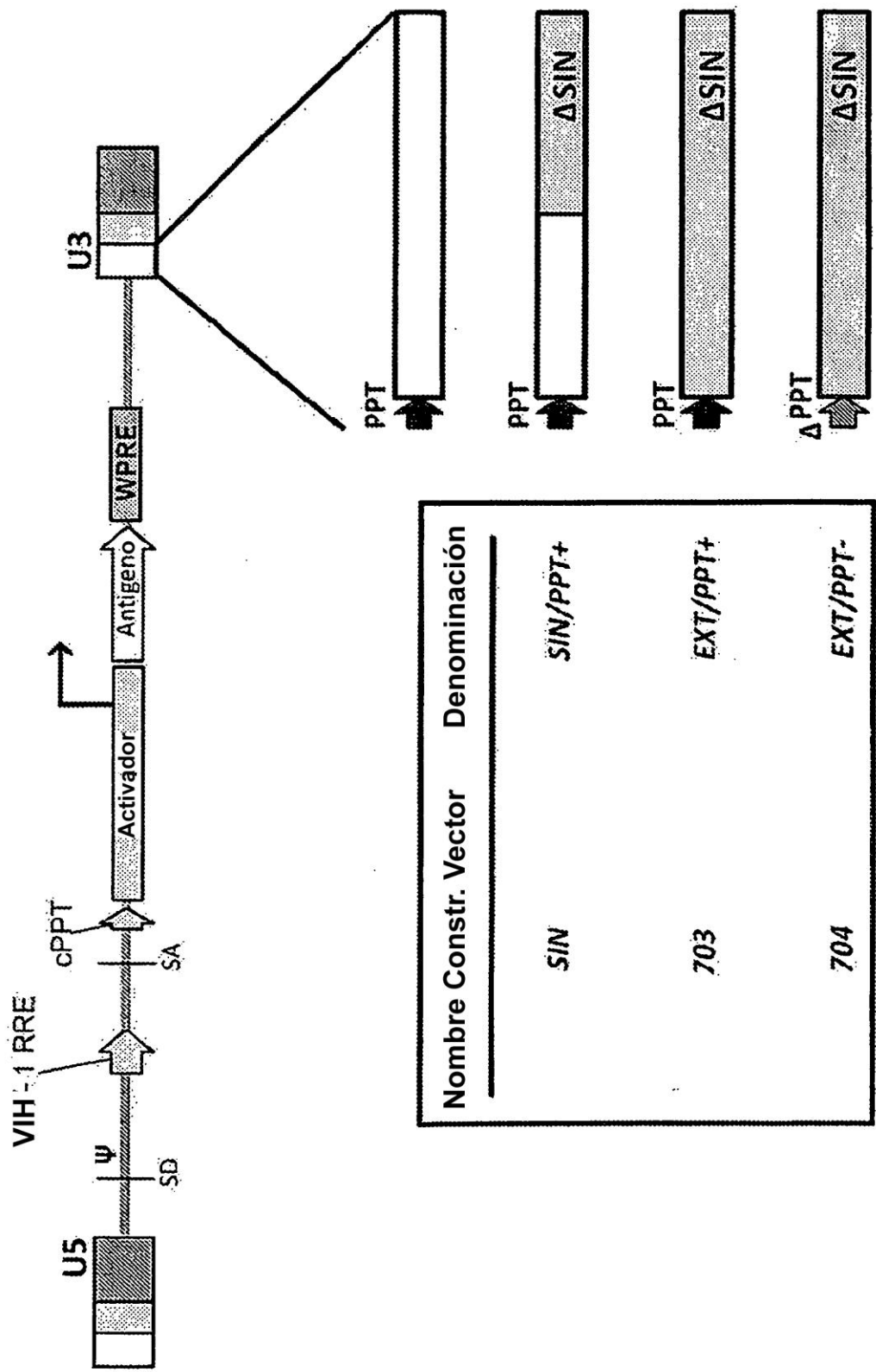


FIGURA 5A

FIGURA 5B

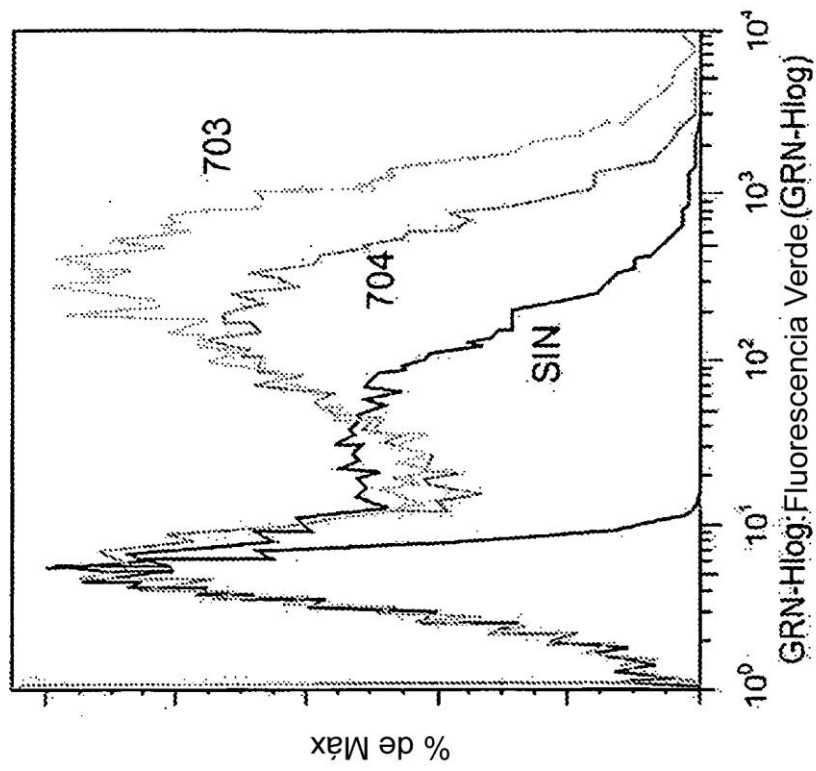


FIGURA 6B

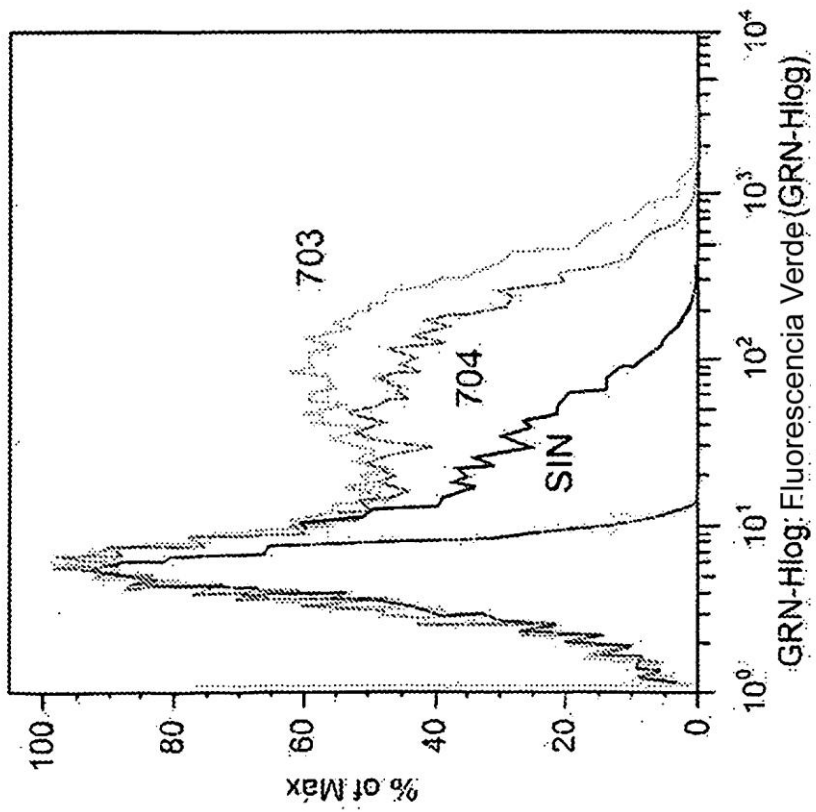


FIGURA 6A

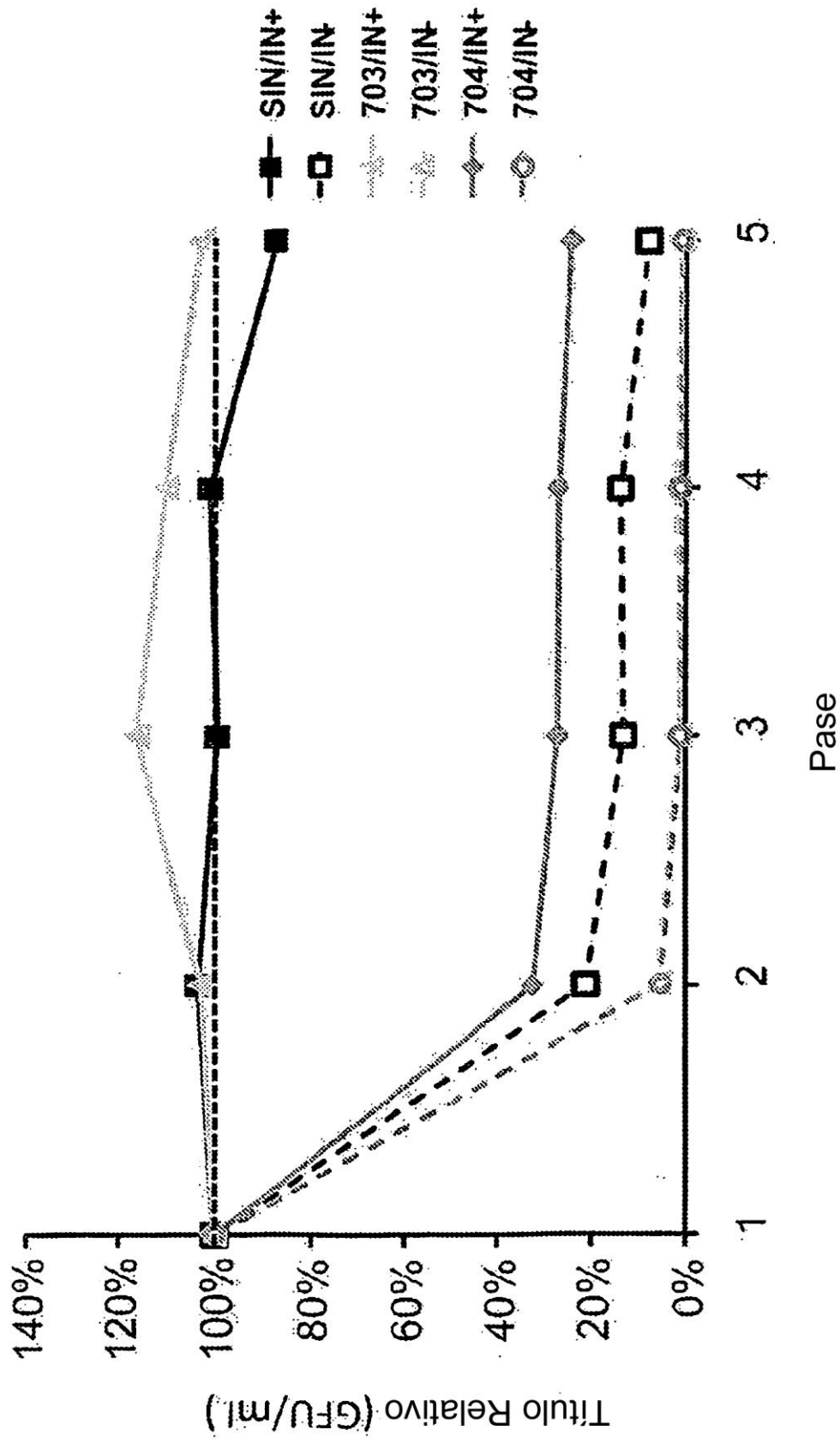


FIGURA 7

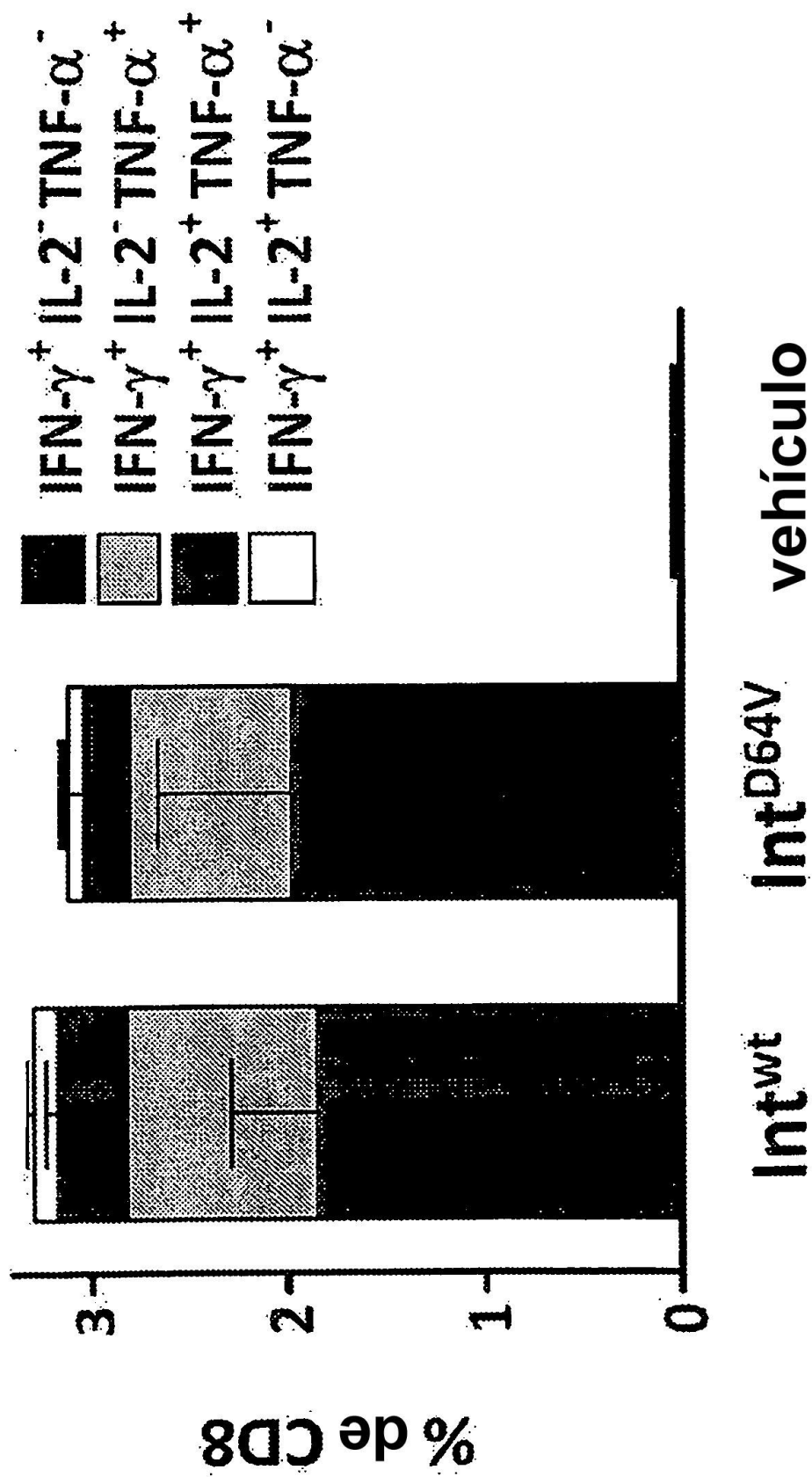


FIGURA 8

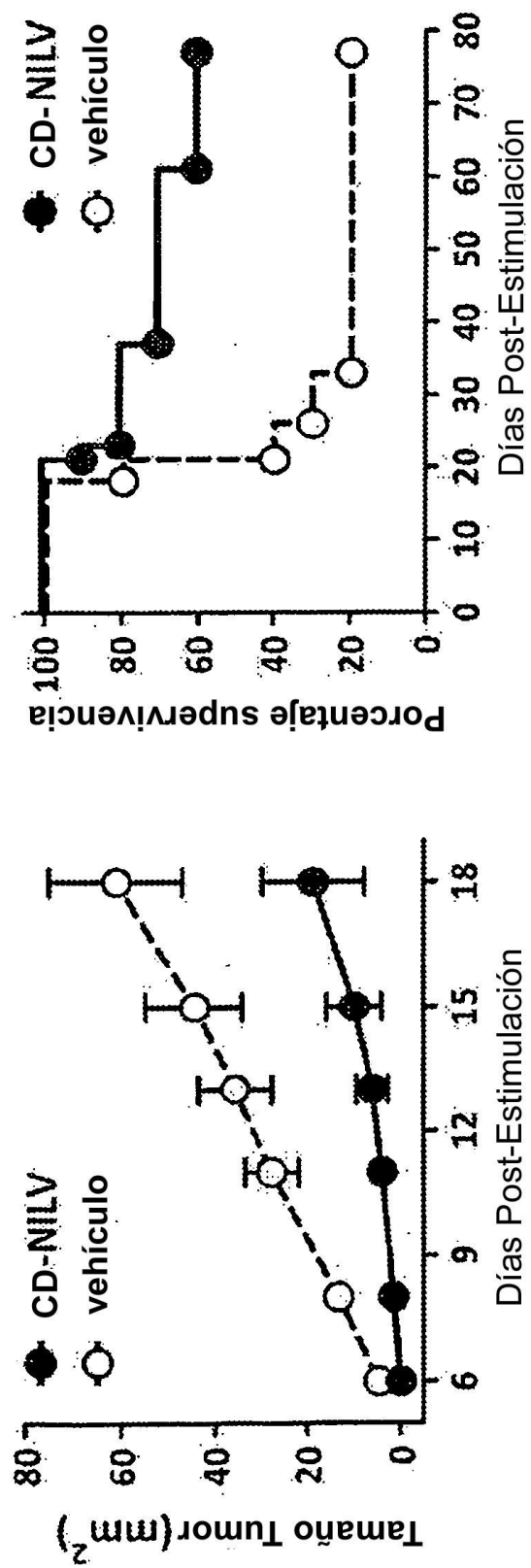


FIGURA 9