

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 144**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/867** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

**C07K 14/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2007 E 07290980 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2020444**

54 Título: **Vectores de transferencia lentivíricos defectuosos que no se integran para vacunas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.09.2017**

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (100.0%)  
25-28, RUE DU DOCTEUR ROUX  
75724 PARIS CEDEX 15, FR**

72 Inventor/es:

**CHARNEAU, PIERRE y  
COUTANT, FRÉDÉRIC PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 634 144 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 transferencia lentivíricos defectuosos que no se integran para vacunas

## Antecedentes

5 La prevención de enfermedades infecciosas a través del desarrollo de vacunas es uno de los mayores logros de la medicina moderna. Sin embargo, todavía existen desafíos considerables para el desarrollo de nuevas vacunas que combinen eficacia con perfiles de seguridad mejorados. En los últimos tiempos, los vectores lentivíricos (VL), tales como los vectores lentivíricos derivados del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH), han surgido como herramientas de vacunación promisorias. Estos vectores provocan respuestas inmunitarias citotóxicas específicas y humorales intensas en varios modelos animales. Estas propiedades y, especialmente la eficacia de la inmunidad adaptativa, dependen en parte del hecho de que el VL que se integra puede mediar la transferencia génica e integración en las células dendríticas (CD) de forma eficaz que permiten una presentación constante de antígenos tumorales o víricos (Ag) y la posterior activación de los linfocitos T indiferenciados. Asimismo, los problemas de la inmunidad específicos de los vectores se reducen en gran medida con el uso de VL debido a la ausencia de inmunidad preexistente en humanos y debido al hecho de que el VL no contiene genes que codifican para proteínas víricas del VIH-1, lo cual permite inmunizaciones repetidas.

10 Aunque se ha demostrado que las vacunas basadas en VL que se integra provocan inmunidad protectora y específica contra tumores y agentes infecciosos, su transición desde la evaluación preclínica al desarrollo clínico como vectores para vacunación se ve impedida por el problema de la potencial mutagénesis por inserción ligada a la integración pseudoaleatoria del transgén en el genoma de las células transducidas. Estos eventos de integración pueden provocar efectos secundarios graves, como desafortunadamente lo ilustraron los tres casos de leucemia en el ensayo de terapia génica de SCID-X1, donde se desencadenó un crecimiento celular transformado por la integración del vector rotavírico derivado de Moloney muy próximo al protooncogén LMO2. Se ha demostrado adicionalmente que la oncogénesis se produjo como consecuencia de una proximidad potenciadora de la secuencia del vector en el protooncogén LMO2.

15 Diversos argumentos señalan que el uso de VL que se integra, especialmente en el campo de la vacunación, representa un riesgo menor de oncogénesis potencial ligada a eventos de mutagénesis por inserción. En primer lugar, en un escenario de vacunación basado en la inyección directa de VL que se integra codificante para el Ag, las células transducidas que expresan el Ag relevante se convierten en dianas de la respuesta inmunitaria provocada y se cree que se eliminan rápidamente del organismo vacunado. En segundo lugar, la supresión en LTR (siglas en inglés para «repetición terminal larga») en 3' de las secuencias promotoras y potenciadoras víricas en el VL autodesactivante limita la probabilidad de una activación promotora endógena. En tercer lugar, aunque muchos linfocitos de pacientes infectados por VIH llevan una gran cantidad de provirus integrados a VIH transcripcionalmente activos, no se reconoce que los eventos que se producen en las células infectadas causen oncogénesis. De manera congruente, un estudio reciente proporcionó evidencia de que la transducción de VL, incluso con cargas de integración elevadas, no acelera la tumorigénesis en un modelo murino susceptible a tumores. Sin embargo, se deben llevar a cabo investigaciones de forma activa para resolver el problema de la mutagénesis por inserción dado que las consideraciones de seguridad son la principal limitación para la aceptación de VL en el desarrollo clínico. En este contexto, el desarrollo de VL que permite una integración dirigida o que no se integra en absoluto representaría un paso importante para el desarrollo de vectores completamente seguros.

20 La solicitud de patente WO2006/010834 describe el diseño y el uso de lentivirus con integración deficiente (VL). Estos vectores incluyen una integrasa defectuosa con la mutación D64V en el dominio catalítico de la enzima, que bloquea de manera específica las reacciones de escisión y unión de ADN de la etapa de integración. La mutación D64V disminuye la integración del VIH-1 seudotipificado hasta 1/10.000 con respecto al natural, pero mantiene su capacidad para transducir células permanentes y permite la expresión eficaz del transgén. Los mutantes de la integrasa del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 conservan la actividad de integrasa *in vitro*, pero no logran integrar el ADN vírico de manera eficaz durante la infección (Leavitt et al. J. Virol. 1996 Feb; 70(2): 721-8). Se ha demostrado que estos vectores transducen de manera eficaz células primarias tales como las células neuronales o retinales y ayudan en modelos representativos de degeneración retinal. Sin embargo, en esta solicitud de patente, los estudios se limitaron a dirigirse a células retinales y neuronales y a la expresión de un transgén en estas células. La eficacia de dichos vectores en mecanismos biológicos complejos que implican interacción célula-célula, tales como la respuesta inmunitaria, se ha demostrado en Negri et al. 2007, Molecular Therapy, 15(9), p.1716. No obstante, no se ha descrito la dosis necesaria para obtener una respuesta inmunitaria que proteja contra la exposición a un patógeno.

25 Por lo tanto, existe la necesidad de métodos para suscitar respuestas inmunitarias específicas y eficaces, con vectores seguros y específicos. La presente invención satisface esta necesidad al proporcionar vectores no integrantes (también denominados vectores que no se integran o vectores no competentes para la integración) que comprenden una proteína integrasa defectuosa y que comprenden, además, un genoma de ARN que es el producto de transcripción de un genoma de vector que comprende un polinucleótido que codifica para al menos un polipéptido

antigénico, dos LTR y una solapa de ADN que comprende los dominios cPPT y CTS, en la fabricación de una composición inmunógena para provocar una respuesta inmunitaria protectora contra dicho al menos un polipéptido antigénico para prevenir la infección por un patógeno o estados neoplásicos, en un paciente humano al que se le administró dicha composición inmunógena que comprende dosis de dicho vector lentivírico de VIH que varían de 1 µg a 100 µg de antígeno p24, en donde dicha proteína integrasa defectuosa es una integrasa que tiene una mutación clase I para alterar específicamente su actividad de integrasa. La descripción también describe vectores que no se integran como herramientas de vacunación, y su uso para inducir o provocar una respuesta inmunitaria, y especialmente una respuesta inmunitaria humoral protectora. De hecho, en virtud del comportamiento no integrante de los vectores usados, se cuestionó si el polipéptido antigénico codificado se produciría en una cantidad suficiente y/o durante un tiempo suficiente para permitir una presentación eficaz de células inmunitarias y finalmente una respuesta inmunitaria eficaz y específica para el antígeno. Por lo tanto, se evaluó por ensayo si la inducción de respuestas inmunitarias, tales como respuestas inmunitarias específicas para antígeno, en estrategias de vacunación que implican vectores lentivíricos, debería producirse a pesar del fracaso de dicho vector en la integración, dado que las principales células diana son las CD permanentes. La presente invención muestra que los vectores lentivíricos (VL) que no se integran no solo son eficaces en la transducción de células inmunitarias, tales como las CD, sino que también una única inmunización con estos vectores que expresan un polipéptido antigénico, por ejemplo, la forma secretada de la envoltura del virus del Nilo occidental, puede predisponer la respuesta inmunitaria y confiere protección contra una exposición letal.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1: Transducción eficaz de células permanentes con VL defectuoso para integración. Se transdujeron células HeLa tratadas con afidicolina con dosis escalonadas (de 1 a 100 ng de antígeno p24 por ml de medio) de VL que se integra de eGFP (eGFP-VLI) o VL que no se integra de eGFP (eGFP-VLNI). 48 horas después de la transducción, se analizó la expresión de eGFP mediante citometría de flujo. El panel superior muestra el porcentaje de células positivas para GFP y el panel inferior muestra la MFI (intensidad fluorescente media) de las células positivas para GFP.

Figura 2: La transducción del vector lentivírico conduce una expresión de antígeno eficaz en las células dendríticas convencionales (CDc) y en las CD plasmocitoides (CDp). (A) Experimentos de transducción de respuesta a la dosis (de 0 a 300 ng/ml) con VL que se integra de eGFP (eGFP-VLI) o VL que no se integra de eGFP (eGFP-VLNI) o con 300 ng/ml de eGFP-VLI o eGFP-VLNI inactivado por calor (IC). El día 6, se expusieron FL-CD a partículas de vector durante 48 horas y se evaluó la transducción de las células positivas para CD11c al medir la expresión de eGFP mediante citometría de flujo. Las cifras indican el porcentaje de células CD11c que expresan eGFP. (B) Transducción de CDp y CDc por VL. Se muestra la expresión de eGFP por CDc (CD11c<sup>+</sup> B220<sup>-</sup>) y CDp (CD11c<sup>+</sup> B220<sup>+</sup>). Líneas delgadas, células testigo; perfiles rellenos, FL-CD transducidas con 300 ng/ml de partículas de vector.

Figura 3: Una única dosis de  $s_{E_{WNV}}-VLNI$  provoca una respuesta de anticuerpo intensa y específica. Grupos de ratones adultos recibieron inmunización i.p. con dosis escalonadas de  $s_{E_{WNV}}-VLNI$  (de 1 a 100 ng de antígeno p24) (A, B) o  $s_{E_{WNV}}-VLI$  (B). Se inyectó  $s_{E_{WNV}}-VLNI$  (A, B) o I (B) inactivado por calor (IC 100) a ratones testigo. Después de 21 días, se evaluaron los sueros combinados (6 ratones por grupo) para determinar los anticuerpos específicos para WNV.

Figura 4: Protección rápida contra infección por WNV conferida por la inmunización con  $s_{E_{WNV}}-VLNI$ . Se vacunó a seis ratones/grupo con 100ng de  $s_{E_{WNV}}-VLNI$  o 100ng de  $s_{E_{WNV}}-VLI$ . Se incluyó un grupo testigo de ratones inoculados con solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). Una semana después de la vacunación, se expuso a los ratones a  $DL_{50}$  1000 i.p. de la cepa IS-98-ST1 de WNV. La supervivencia se registró durante 21 días.

Figura 5: Protección eficaz a largo plazo mediante  $s_{E_{WNV}}-VLNI$  contra infección por WNV. Dos meses después de la inmunización con dosis escalonadas de  $s_{E_{WNV}}-VLNI$  (1-100 ng de antígeno p24) (A, B) o  $s_{E_{WNV}}-VLI$  (B), se inoculó a los ratones con  $DL_{50}$  1000 i.p. de la cepa IS-98-ST1 de WNV. La supervivencia se registró durante 21 días.

Figura 6: Secuencias de nucleótidos de diversas SOLAPAS DE ADN de retrovirus según se definen en diferente virus: CAEV (SEQ ID N. °: 1), EIAV (SEQ ID N. °:2), VISNA (SEQ ID N. °:3), SIV AGM (SEQ ID N. °:4), HIV-2 RID (SEQ ID N. °:5), VIH-1 LAI (SEQ ID N. °:6) y VIH-1 (SEQ ID N. °:7).

Figura 7: (A) Organización de la construcción de genoma de vector a los efectos de la invención, basada en una secuencia de genoma de VIH-1 típica; (B) Representación esquemática del vector TRIP/ $s_{E_{WNV}}$ . Se utilizan las siguientes abreviaturas: U3, R y U5 representan los dominios de la LTR;  $\Delta U3$ : supresión del dominio U3; RRE: Elemento sensible a Rev;  $\psi$ : señal de encapsidación; cPPT y CTS representan la solapa de ADN; CMVie: promotor temprano inmediato de citomegalovirus.

Figura 8: Secuencia de nucleótidos del vector TRIPs $s_{E_{WNV}}$ . La región cPPT/CTS está subrayada. En esta región, los dominios cPPT y CTS aparecen en minúsculas. La secuencia  $s_{E_{WNV}}$ , representada en negrita, es un inserto de ADN

de BsiWI-BssHII. Este vector se ha depositado en la CNCM (siglas en inglés para «Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos») (París, Francia), con el número I-3076, el 27 de agosto de 2003.

5 Figura 9: Secuencia de nucleótidos del vector TRIP GFP. La región cPPT/CTS está subrayada. En esta región, los dominios cPPT y CTS aparecen en minúsculas. La secuencia de GFP se ubica entre los 2816 y 3573. Este vector se ha depositado en el CNCM con el número I-2330, el 11 de octubre de 1999 (pTRIP [deltaU3] CMV GFP).

Figura 10: Secuencias proteicas de VSV-G de diversos serotipos conocidos en el género Vesiculovirus para la especie VSV: Indiana (Número de acceso de NCBI J02428), Chandipura (J04350), Piry (D26175), New Jersey, Cocal (AF045556), Isfahan (AJ810084) y viremia primaveral de la carpa (SVCV, por sus siglas en inglés)(AY527273).

10 Figura 11: Envoltura recombinante de VSV obtenida mediante la recombinación de secuencias de los serotipos New Jersey e Indiana. El VSV-G ECTO (NJ)-TM (IND) contiene el dominio transmembranario de Indiana VSV-G y el ectodominio del serotipo New-Jersey (SEQ ID N.º:8).

#### Descripción detallada

15 La presente invención se refiere al uso de un vector lentivírico en el que la proteína integrasa expresada es defectuosa y que comprende, además, un polinucleótido que codifica para al menos un polipéptido antigénico, para producir una composición inmunógena adecuada para provocar una respuesta inmunitaria contra dicho al menos un polipéptido, en un hospedador que la necesita. Dicho uso de dicho vector lentivírico está comprendido en la invención en tanto que está comprendido en el alcance de las reivindicaciones.

20 La expresión «vector lentivírico» abarca una partícula de vector lentivírico que comprende las proteínas y el material genético, preferiblemente encapsidado en estas proteínas. Las partículas están hechas de proteínas de envoltura vírica (codificadas por un gen *env*), así como de proteínas estructurales (codificadas por un gen *gag*). Dentro de las partículas se encuentra un núcleo vírico (o cápside) formado por tres enzimas (codificadas por un gen *pol*), es decir, la transcriptasa inversa, la integrasa y la proteasa, y el material genético (genoma lentivírico). En la presente invención, es esencial que la proteína integrasa sea una proteína integrasa defectuosa.

25 Se entiende por «defectuoso/a» que la integrasa, preferiblemente de origen lentivírico, carece de la capacidad de integrar el genoma lentivírico en el genoma de las células hospedadoras, es decir, una proteína integrasa mutada para alterar de manera específica su actividad de integrasa. Por lo tanto, la capacidad de integrasa de la proteína se altera, mientras que permanecen intactas la expresión correcta de las proteínas GAG, PRO y POL y/o la formación de la cápside y, por consiguiente, de las partículas de vector, así como otras etapas del ciclo vírico, anteriores o posteriores a la etapa de integración, tales como la transcripción inversa, la importación del núcleo. Se dice que una integrasa es defectuosa cuando la integración que debería posibilitar se altera de tal manera que una etapa de integración se produce menos de 1 vez en 1000, preferiblemente menos de 1 vez en 10000, en comparación con un vector lentivírico que contiene la integrada natural correspondiente.

35 La propiedad de defectuosa de la integrasa resulta de una mutación de clase 1, preferiblemente, sustituciones de aminoácidos (sustitución de un aminoácido) o supresiones cortas que dan lugar a una proteína que cumple con los requisitos del párrafo anterior. La mutación se lleva a cabo dentro del gen *pol*. Los ejemplos de mutaciones que alteran el VIH-1 y permiten obtener una integrasa no funcional para la integración (integrasa no competente para integración) son los siguientes: H12N, H12C, H16C, H16V, S81R, D41A, K42A, H51A, Q53C, D55V, D64E, D64V, E69A, K71A, E85A, E87A, D116N, D116I, D116A, N120G, N120I, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, 40 E157A, K159E, K159A, K160A, R166A, D167A, E170A, H171A, K173A, K186Q, K186T, K188T, E198A, R199C, R199T, R199A, D202A, K211A, Q214L, Q216L, Q221L, W235F, W235E, K236S, K236A, K246A, G247W, D253A, R262A, R263A y K264H. Otra sustitución propuesta es el reemplazo de los residuos de aminoácidos RRK (posiciones 262 a 264) por los residuos de aminoácidos AAH. En una realización específica, se prefieren las siguientes sustituciones: H12N, H12C, H16C, H16V, S81R, D41A, K42A, H51A, Q53C, D55V, D64E, D64V, E69A, 45 K71A, E85A, E87A, D116I, D116A, N120G, N120I, N120E, E152G, E152A, D35E, K156E, K156A, E157A, K159E, K159A, K160A, R166A, D167A, E170A, H171A, K173A, K186Q, K186T, K188T, E198A, R199C, R199T, R199A, D202A, K211A, Q214L, Q216L, Q221 L, W235F, W235E, K236S, K236A, K246A, G247W, D253A, R262A, R263A y K264H. Una mutación particularmente adecuada es la mutación D64V, que se ha demostrado, dentro de la presente invención, que proporciona buenos resultados en los estudios de vacunación.

50 La proteína de envoltura del vector lentivírico para uso según la invención se puede pseudotipificar con la proteína de envoltura del lentivirus utilizado para preparar el vector lentivírico o, alternativamente, con una proteína de envoltura heterogénea que se elige con respecto a las células que serán diana en el hospedador.

En una realización preferida, dicho vector lentivírico se pseudotipifica con una proteína VSV-G. La glicoproteína VSV-G se puede originar de diferentes serotipos del género de los vesiculovirus: el serotipo VSV-Indiana, el serotipo VSV-New Jersey u otras glicoproteínas de los vesiculovirus tales como Piry, Chandipura, Isfahan y Cocal (Figura 10). La glicoproteína VSV-G se elige entre las especies clasificadas en el género de vesiculovirus: virus Carajas

(CJSV, por sus siglas en inglés), virus Chandipura (CHPV, por sus siglas en inglés), virus Cocal (COCV, por sus siglas en inglés), virus Isfahan (ISFV, por sus siglas en inglés), virus Maraba (MARAV, por sus siglas en inglés), virus Piry (PIRYV, por sus siglas en inglés), virus de la estomatitis vesicular Alagoas (VSAV, por sus siglas en inglés), virus de la estomatitis vesicular Indiana (VSIV, por sus siglas en inglés) y virus de la estomatitis vesicular New Jersey (VSNJV, por sus siglas en inglés) y/o el rhabdovirus de la carpa herbívora, virus BeAn 157575 (BeAn 157575, por sus siglas en inglés), virus Boteke (BTKV, por sus siglas en inglés), virus Calchaqui (CQIV, por sus siglas en inglés), virus de la anguila americana (EVA, por sus siglas en inglés), virus Gray Lodge (GLOV, por sus siglas en inglés), virus Jurona (JURV, por sus siglas en inglés), virus Klamath (KLAV, por sus siglas en inglés), virus Kwatta (KWAV, por sus siglas en inglés), virus La Joya (LJV, por sus siglas en inglés), virus Malpais Spring (MSPV, por sus siglas en inglés), virus del murciélago Monte Elgon (MEBV, por sus siglas en inglés), virus Perinet virus (PERV, por sus siglas en inglés), rhabdovirus de cría de lucio (PFRV, por sus siglas en inglés), virus Porton (PORV, por sus siglas en inglés), virus Radi (RADIV, por sus siglas en inglés), viremia primaveral de la carpa (SVCV, por sus siglas en inglés), virus Tupaia virus (TUPV, por sus siglas en inglés), rhabdovirus de enfermedad ulcerosa (UDRV, por sus siglas en inglés) y virus Yug Bogdanovac (YBV, por sus siglas en inglés). En una realización específica, la proteína VSV-G que se origina de un VSV se modifica con respecto a su forma natural, especialmente para mejorar la seudotipificación.

En una realización específica, la proteína de envoltura comprende dominios o fragmentos que se originan a partir de diferente(s) proteína(s) de envoltura de virus diferentes, especialmente de diferentes géneros de diferentes especies de VSV. En el caso de VSV, la proteína G comprende o consiste en el dominio transmembranario del VSV indiana y el ectodominio de una cepa de un serotipo de VSV diferente. En una realización específica, la(s) proteína(s) de envoltura comprende el dominio transmembranario de VSV indiana y el ectodominio de VSV New-Jersey (Figura 11; SEQ ID N.º:8).

Otras modificaciones adecuadas abarcan mutaciones, especialmente mutaciones puntuales que mejoran la seudotipificación. Dichas mutaciones para las proteínas VSV-G se pueden llevar a cabo en el dominio transmembranario al sustituir o suprimir uno o varios residuos de aminoácidos. Otros ejemplos de mutaciones se describen en Fredericksen B.L. et al (J. Virol. (1995) 69: 1435-1443) o Nishimura N. et al (PNAS (2002) 99: 6755-6760).

En otro aspecto, dicho vector lentivírico se pseudotipifica con la proteína HA (hemaglutinina de la gripe), la proteína RD114, envolturas modificadas con ligandos específicos de célula insertados o con proteínas de envoltura vírica originadas a partir un virus seleccionado en uno o varios de los siguientes órdenes y familias: Arenaviridae, Flaviridae, Togaviridae, Coronaviridae, Orthomyxoviridae, Retroviridae y Mononegavirales incluidos Paramyxoviridae, Rhabdoviridae o Filoviridae. Cualquier proteína de envoltura vírica es adecuada para seudotipificación, asumiendo que la seudotipificación es compatible con las etapas de producción y purificación de partículas de vector lentivírico.

Las células específicas a las que se dirigen los vectores lentivíricos para uso según la presente invención son células que participan en la respuesta inmunitaria, tales como células que presentan antígeno (CPA), células dendríticas (CD), incluidas las CD convencionales (CDc) o plasmocitoides (CDp), linfocitos T, incluidos CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, linfocitos B, monocitos, macrófagos, linfocitos citolíticos naturales, linfocitos T citolíticos naturales, células endoteliales y células epiteliales. De forma interesante, recientemente se ha demostrado que los linfocitos B interactúan con CD maduras en circulación, que de esta forma activan los linfocitos B, que a su vez presentan antígenos de forma eficaz para linfocitos T indiferenciados (amplificación de la población de CPA maduras); por lo tanto, se señala así el papel fundamental de los linfocitos B en la predisposición de las células que participan en la respuesta inmunitaria celular y, específicamente, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> indiferenciados (Diaz de Durana; 2006).

El polinucleótido que codifica para al menos un polipéptido antigénico está comprendido dentro del genoma del vector lentivírico, es decir, el material genético del vector lentivírico (es decir, en la partícula). La expresión «genoma de vector» hace referencia al ácido nucleico que es adecuado para constituir el genoma de las partículas del vector lentivírico. Por consiguiente, la expresión se refiere a cualquier ácido nucleico adecuado, es decir, ADN o ARN, ya sea bi o monocatenario, incluida la forma que contiene la solapa de ADN como una secuencia triple, dependiendo del estadio del ciclo de las partículas, incluido el plásmido de vector, utilizado para la cotransfección de las células hospedadoras con el plásmido de encapsidación y el plásmido de envoltura, para la expresión de las partículas, o el genoma de ARN de las partículas cuando se forma, o las diversas formas del ácido nucleico de este genoma en las células transducidas del hospedador al cual se administran las partículas, incluido el complejo de preintegración del vector.

La estructura y composición del genoma de vector utilizado para preparar los vectores lentivíricos para uso según la invención corresponden a las descritas en la técnica. Especialmente, se pueden preparar vectores de suministro de gen lentivírico mínimo a partir de un genoma de vector, que solo contiene, aparte del polinucleótido heterólogo de interés terapéutico, las secuencias del genoma lentivírico que no son regiones codificantes de dicho genoma, necesarias para proporcionar las señales de reconocimiento para la síntesis del ADN o ARN y el procesamiento. Por lo tanto, un genoma de vector puede ser un vector de reemplazo en el que todas las secuencias codificantes víricas

entre las 2 repeticiones terminales largas (LTR) han sido reemplazadas por el polinucleótido de interés. Sin embargo, dicho genoma de vector también comprende adicionalmente un polinucleótido que consiste en la solapa de ADN.

- 5 La solapa de ADN (definida en Zennou V. et al 2000, Cell vol 101, 173-185 o en WO 99/55892 y WO 01/27304), es una estructura que es central en el genoma de algunos lentivirus, especialmente en retrovirus VIH, donde da lugar a una estructura de ADN de 3 cadenas que se sintetiza normalmente durante la transcripción inversa del VIH especialmente y que actúa como un determinante en cis de la importación nuclear del genoma del VIH. La solapa de ADN permite un evento de desplazamiento de la cadena central controlado en cis mediante el tracto de polipurina central (cPPT, por sus siglas en inglés) y la secuencia de terminación central (CTS, por sus siglas en inglés) durante la transcripción inversa. Cuando se inserta en vectores derivados de lentivirus, el polinucleótido que permite que se produzca la solapa de ADN durante la retro-transcripción, estimula la eficacia de la transferencia génica y complementa el nivel de importación nuclear hasta niveles naturales (Arhel N. et al, Retrovirology 2006, 3:38, 26 de junio de 2006, *Wild-type and central DNA flap defective HIV-1 lentiviral vector genomes: intracellular visualization at ultra structural resolution levels*).
- 10 En un aspecto específico, la solapa de ADN se inserta inmediatamente después del polinucleótido que codifica para el al menos un polipéptido antigénico, para tener, de forma ventajosa, una posición central en el genoma de vector. Se puede obtener una solapa de ADN adecuada para uso en la invención de un retrovirus, especialmente de un lentivirus, o de un organismo similar a un retrovirus, tal como retrotransposón, ya sea preparado sintéticamente (síntesis química) o mediante amplificación de la solapa de ADN de cualquier retrovirus, especialmente de un ácido nucleico de lentivirus, tal como mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). La solapa de ADN se puede obtener de un retrovirus, especialmente un lentivirus, especialmente de un retrovirus o lentivirus humano y, en particular, del retrovirus VIH, o del virus CAEV (virus de la encefalitis artritis-caprina), del virus EIAV (virus de la anemia infecciosa equina), del virus VISNA, del virus SIV (virus de la inmunodeficiencia en simios) o del virus FIV (virus de la inmunodeficiencia felina). En una realización más preferida, la solapa de ADN se obtiene de un retrovirus VIH, por ejemplo, el virus VIH-1 o VIH-2, incluido cualquier aislado de estos dos tipos. La solapa de ADN preferida comprende o consiste en las secuencias según se definen en SEQ ID N.º: 1 a 7 (Figura 6). Cabe señalar que la solapa de ADN se utiliza como un fragmento de ADN aislado de su contexto nucleotídico (genoma vírico) natural, es decir, fuera del contexto del gen *pol* en el que está contenido naturalmente en el genoma del lentivirus. Por lo tanto, la solapa de ADN se utiliza, en la presente invención, suprimida de las partes en 5' y 3' innecesarias del gen *pol* y se recombina con secuencias de origen diferente. Una solapa de ADN se puede preparar sintéticamente (síntesis química) o mediante amplificación del ADN que proporciona la solapa de ADN de la fuente adecuada, según se definió anteriormente, tal como mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En una realización más preferida, la solapa de ADN se obtiene de un retrovirus VIH, por ejemplo, el virus VIH-1 o VIH-2, incluido cualquier aislado de estos dos tipos.
- 15 Se insertan preferiblemente en el genoma del vector en una posición que es central o casi central con respecto a dicho genoma de vector. Alternativamente, se pueden insertar inmediatamente después del promotor que controla la expresión del polinucleótido.
- 20 Según un aspecto específico, una solapa de ADN tiene una secuencia de nucleótidos de alrededor de 90 a alrededor de 140 nucleótidos. En el VIH-1, la solapa de ADN es una superposición de cadena positiva estable con 99 nucleótidos de longitud. Cuando se utiliza en el vector de genoma del vector lentivírico para uso según la invención, se puede insertar como una secuencia más larga, especialmente cuando se prepara como un fragmento de PCR. Un polinucleótido específico adecuado que comprende la estructura que proporciona la solapa de ADN es un fragmento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de 178 pares de bases que comprende las regiones cPPT y CTS del ADN del VIH-1.
- 25 El genoma del vector lentivírico puede comprender señales reguladoras para la transcripción y expresión de origen no lentivírico, tales como un promotor y/o un potenciador. Los ejemplos de promotores que se pueden utilizar para provocar una respuesta inmunitaria son CMV, también denominados CMVie (CMV temprano inmediato), promotor EF1 $\alpha$ , promotor CGA, promotor CD11c y los promotores génicos constitutivos tales como el promotor PGK, el promotor de ubiquitina, promotor de actina, promotor de histona, promotor de alfa-tubulina, promotor de beta-tubulina, promotor de superóxido dismutasa 1 (SOD-1), promotor de dihidrofolato reductasa (DHFR), promotor de hipoxantina fosforribosiltransferasa (HPRT), promotor de adenosina desaminasa, promotor de timidilato sintetasa, promotor de dihidrofolato reductasa P1, promotor de glucosa-6-fosfato sehidrogenasa o promotor de nucleolina. En un aspecto específico, dicho polinucleótido que codifica para dicho al menos un antigénico está bajo el control de señales reguladoras para la transcripción y expresión.
- 30 Dicho genoma de vector lentivírico comprende todos los elementos necesarios para la importación nucleica y la correcta expresión del polinucleótido que codifica para el al menos un polipéptido antigénico. Como ejemplos de elementos que se pueden insertar en el genoma lentivírico del vector lentivírico para uso según la invención están al menos dos repeticiones terminales largas (LTR), tales como LTR5' y LTR3', una secuencia psi que participa en la encapsidación del genoma lentivírico y al menos una solapa de ADN que comprende los dominios cPPT y CTS.

En un aspecto específico, la LTR, preferiblemente la LTR3', se suprime para el promotor y el potenciador de U3; se ha demostrado que esta modificación aumenta sustancialmente la transcripción del transgén insertado en el genoma lentivírico (WO01/27304).

5 El genoma de vector lentivírico puede comprender, además, elementos seleccionados entre un sitio donador de empalme (SD), un sitio aceptor de empalme (SA) y/o un elemento sensible a Rev (RRE). En un aspecto específico, el genoma de vector puede comprender además uno o varios sitios de restricción únicos para clonar el polinucleótido que codifica para dicho al menos un polipéptido antigénico.

10 En una realización específica de la invención, el genoma del vector lentivírico comprende, además, un origen de replicación (ori), cuya secuencia depende de la naturaleza de las células donde se ha expresado el genoma lentivírico. Dicho origen de replicación puede ser de origen eucarionte, preferiblemente de origen mamífero, más preferiblemente de origen humano. Una realización ventajosa de la invención es tener un origen de replicación insertado en el genoma lentivírico del vector lentivírico de la invención. De hecho, dado que el genoma lentivírico no se integra en el genoma de las células hospedadoras (debido a la integrasa defectuosa), el genoma del vector lentivírico se pierde en las células que sufren frecuentes divisiones celulares; lo cual se produce particularmente en las células inmunitarias, tales como los linfocitos B o T. La presencia de un origen de replicación garantiza que al menos un genoma lentivírico esté presente en cada célula, incluso después de la división celular, lo que aumenta al máximo la eficacia de la respuesta inmunitaria.

20 Además de los elementos mencionados anteriormente, el genoma lentivírico puede comprender, además, al menos una región de acoplamiento de supercóntigo (SAR, por sus siglas en inglés) y/o región de acoplamiento de matriz (MAR, por sus siglas en inglés). De hecho, estas secuencias ricas en AT permiten anclar el genoma lentivírico a la matriz del cromosoma celular y regular, de esta manera, la transcripción del polinucleótido que codifica para al menos un polipéptido antigénico, y particularmente, estimular la expresión génica del transgén y mejorar la accesibilidad a la cromatina.

25 En realizaciones específicas de la invención, ya sea independientemente de o en combinación con las realizaciones descritas a lo largo de la memoria descriptiva, el genoma de vector lentivírico carece de los genes lentivíricos *gag*, *pol* y/o *env* funcionales. Se entiende por «funcional» un gen que se transcribe correctamente y/o se expresa correctamente. Por lo tanto, el genoma del vector lentivírico de la invención en esta realización contiene al menos uno de los genes *gag*, *pol* y *env* que no se transcribe o se transcribe de forma incompleta; la expresión «se transcribe de forma incompleta» hace referencia a la alteración en los transcritos *gag*, *gag-pro* o *gag-pro-pol*, donde uno de estos o varios de estos no se transcriben. En una realización específica, el genoma lentivírico carece de los genes lentivíricos *gag*, *pol* y/o *env*.

30 En una realización específica, el genoma del vector lentivírico también carece de las secuencias codificantes para los genes accesorios *Vif*, *Vpr*, *Vpu* y *Nef* (para los vectores lentivíricos de VIH-1), o de sus genes completos o funcionales.

35 El vector lentivírico para uso según la invención es no replicativo, es decir, el vector y el genoma del vector lentivírico no son capaces de formar partículas nuevas gemantes de la célula hospedadora infectada. Esto se puede lograr mediante la ausencia en el genoma lentivírico de los genes *gag*, *pol* o *env*, como se indicó en el párrafo anterior; esto también se puede lograr al suprimir otra u otras secuencias codificantes víricas y/o elementos genéticos que actúan en cis necesarios para la formación de partículas. La ausencia de replicación del vector lentivírico debe distinguirse de la replicación del genoma lentivírico. De hecho, como se describió anteriormente, el genoma lentivírico puede contener un origen de replicación que garantiza la replicación del genoma de vector lentivírico sin garantizar necesariamente la replicación del vector (o partícula).

45 En un aspecto adicional, particularmente cuando el polinucleótido que codifica para el al menos un polipéptido antigénico se origina de un lentivirus, dicho genoma de vector lentivírico no comprende un polinucleótido completo lentivírico que codifica para *gag*, *pol* o *env*, lo cual significa que dicho genoma de vector lentivírico comprende un polinucleótido más corto que los genes *gag*, *pol* o *env* lentivíricos. Por lo tanto, la secuencia codificante para *gag* tiene menos de 1500 pb para VIH-1 o VIH-2; la secuencia codificante para *pol* tiene menos de 3000 pb para VIH-1 y 3300 pb para VIH-2; la secuencia codificante para *env* tiene menos de 2700 pb para VIH-1 y 2500 pb para VIH-2. Este tamaño hace referencia a la secuencia de nucleótidos continua más larga que se encuentra como tal en el genoma lentivírico natural. Sin embargo, en otra realización específica, el genoma lentivírico carece de todas las secuencias lentivíricas endógenas.

50 El polinucleótido contenido en el genoma del vector lentivírico codifica para al menos un polipéptido antigénico. Se dice que un polipéptido es antigénico cuando su secuencia contiene al menos un péptido (epítipo) capaz de provocar una respuesta inmunitaria cuando se pone en contacto con células que presentan antígeno (APC). El epítipo puede depender de una conformación antigénica tridimensional específica (epítipo conformacional) o puede corresponder a una región de secuencia primaria simple (epítipo lineal). El tamaño del polipéptido varía de al menos 9 aminoácidos hasta 500 aminoácidos, y preferiblemente tiene menos de 200 aminoácidos.

Los polipéptidos antigénicos preferidos comprenden al menos un epítipo B, capaz de provocar una respuesta inmunitaria humoral, particularmente una respuesta humoral protectora, o un epítipo T capaz de provocar una respuesta inmunitaria celular.

5 En una realización específica, el al menos un polipéptido se codifica mediante una secuencia de nucleótidos que se origina del genoma de un patógeno, tal como un virus, especialmente un retrovirus, lentivirus, flavivirus o coronavirus, de una bacteria o de un parásito. La expresión «se origina de» significa que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido tiene una contraparte en el genoma del patógeno. En el caso específico de los virus, el genoma vírico puede estar en la forma natural contenida en el virus (la misma naturaleza del genoma) o en una forma diferente (naturaleza diferente del genoma). Por ejemplo, si el polinucleótido se proporciona en el vector lentivírico para uso según la invención en forma de un ADN bicatenario, mientras que el genoma vírico natural correspondiente está presente naturalmente en forma de un ARN monocatenario, el fragmento del genoma vírico que tiene la secuencia de nucleótidos del polinucleótido se retrotranscribe para proporcionar un fragmento bicatenario. En otro ejemplo, si el polinucleótido se proporciona en el vector lentivírico para uso según la invención en forma de un ARN positivo, mientras que el genoma vírico está presente naturalmente en forma de un ARN negativo, el fragmento del genoma vírico se «replica» para proporcionar la cadena complementaria.

10 En otra realización, e independientemente de o en combinación con las realizaciones de la invención mencionadas anteriormente, al menos un polipéptido comprende o consiste en antígenos superficiales, tales como proteínas de envoltura vírica o de otras membranas, y fragmentos de estas, por ejemplo, envoltura del virus del SIDA, incluidos VIH-1 o VIH-2, o por ejemplo, envoltura del virus de la fiebre amarilla, del virus del Nilo occidental, el virus del Dengue (DV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV) o el coronavirus asociado a SARS (siglas en inglés para «síndrome respiratorio agudo grave»). Otros polipéptidos víricos interesantes provienen de la cápside del VIH.

15 En un aspecto específico, el al menos un polipéptido se codifica mediante un polinucleótido de origen lentivírico (por ejemplo, de *gag* o *pol* o, por ejemplo, de *env*). En un aspecto específico, dichos polinucleótidos codificantes no son el gen *gag* o *pol* completo ni el gen *env* completo, o no son una versión funcional de estos genes, es decir, un gen que codifica una proteína funcional. Por ejemplo, tienen un tamaño que varía de 30 a 500 bp, preferiblemente 30 a 300 bp, más preferiblemente 30 a 100 bp.

En otro aspecto, el polinucleótido que codifica para dicho al menos un polipéptido no se origina de un genoma de lentivirus (por lo tanto, es una secuencia heteróloga con respecto al genoma del vector).

20 Alternativamente, el al menos un polipéptido deriva de un antígeno tumoral o un epítipo tumoral. Los polipéptidos específicos (o parte de estos) son los expresados en la superficie celular de células tumorales. Estos polipéptidos (o parte de estos) se pueden originar a partir de la célula (propio péptido) en una forma natural o mutada; también se pueden originar a partir de un virus que transforma una célula normal en una célula tumoral (virus tumoral). Los ejemplos de dichos virus, agentes etiológicos para el cáncer humano, son el virus del papiloma humano (HPV) que provoca cáncer de cuello de útero, el virus Epstein-Barr que provoca linfoma a través de antígeno de membrana inducido por EBV (EBMA), HTLV-1 que provoca leucemia de linfocitos T aguda (ACT) a través de la proteína tax de HTLV-1, el virus del herpes humano tipo 8 (HHV8), el virus de la hepatitis B (HBV) y el virus de la hepatitis C (HCV).

25 Finalmente, dicho al menos un polipéptido es un polipéptido artificial (no natural), preferiblemente un polipéptido multiepítipo. Este polipéptido multiepítipo codifica para al menos dos epítopos que se originan de un organismo patógeno, incluidos virus y/o de origen tumoral. En un aspecto específico, dichos al menos dos epítopos se originan del mismo virus o de la misma célula tumoral; en tal caso, dichos al menos dos epítopos se pueden seleccionar por su restricción MHC (HLA) diferente. En otro aspecto, dichos al menos dos epítopos se originan de virus diferentes o de células tumorales diferentes. Dichos epítopos se pueden disponer de forma consecutiva, es decir, el extremo 3' del epítipo se enlaza directamente con el extremo 5' del segundo epítipo (y así sucesivamente), correspondientes a un polinucleótido que codifica para una secuencia peptídica compuesta exclusivamente por epítopos consecutivos.

30 Los al menos dos epítopos, alternativamente, se pueden separar mediante un separador de un aminoácido o un separador peptídico, es decir, que las diferentes unidades del polinucleótido están separadas mediante uno o varios codones que codifican respectivamente para uno o varios aminoácidos. Como separadores que mejoran el procesamiento de múltiples epítopos, se prefieren péptidos de 4 aminoácidos compuestos por una arginina (R) en la posición terminal del extremo C y residuos hidrófilos (A, K, D y/o T) en otras posiciones. Especialmente, se pueden utilizar péptidos de 4 aminoácidos que tiene un residuo cargado positivamente o un residuo ácido en la posición terminal del extremo C, de forma dependiendo o independiente de los residuos hidrófilos (A, K, D y/o T) en otras posiciones. En un aspecto específico, dichos separadores son secuencias de procesamiento internas tales como secuencias de procesamiento endosómico o lisosómico, que permiten un procesamiento de los múltiples epítopos y evitar el procesamiento de péptidos nuevos que resultan del corte de la superposición. Dicha separación que recurre a un separador se puede utilizar para separar todos o parte de los epítopos.

35 La expresión «composición inmunógena» hace referencia a una composición que comprende al menos el vector lentivírico para uso según la invención como principio activo, dicha composición es adecuada para administración a un hospedador. Esta composición puede comprender, además, un excipiente o vehículo y/o portador



farmacéuticamente adecuado cuando se utiliza para administración sistémica o local. Un «vehículo farmacéuticamente aceptable» hace referencia a una carga, diluyente, material encapsulante o formulación auxiliar sólido, semisólido o líquido de cualquier tipo convencional. Un «vehículo farmacéuticamente aceptable» no es tóxico para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación. Los vehículos adecuados incluyen, pero no se limitan a, soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua destilada, emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles y similares, dextrosa, glicerol, solución salina, etanol y combinaciones de estos.

La composición inmunógena para uso según la invención tiene la capacidad, a pesar de la ausencia de la integración del transgén en el genoma de la célula hospedadora, de provocar una respuesta inmunitaria, es decir, cualquier reacción del sistema inmunitario del hospedador contra dicho al menos un polipéptido (codificado por dicho transgén).

La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta humoral, es decir, se producen anticuerpos, provocados por dicha composición, contra dicho al menos un polipéptido del vector lentivírico. Dicha respuesta humoral es una respuesta humoral protectora. La respuesta humoral protectora resulta principalmente en anticuerpos maduros, que tienen una afinidad elevada por su antígeno, tal como IgG. En un aspecto específico, la respuesta humoral protectora depende de linfocitos T. En una realización específica, la respuesta humoral protectora induce la producción de anticuerpos neutralizantes.

La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria celular (respuesta inmunitaria de linfocitos T), particularmente una respuesta inmunitaria mediada por CD8 o una respuesta inmunitaria mediada por CD4, es decir, una respuesta inmunitaria medida por células activadas que tienen receptores de CD8 o CD4, preferiblemente linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés).

En una realización específica de la invención, el vector lentivírico a pesar de la integrasa defectuosa, es capaz de provocar una respuesta inmunitaria temprana. La expresión «respuesta inmunitaria temprana» hace referencia a una respuesta inmunitaria protectora (protección contra el patógeno o célula tumoral que tiene dicho al menos un polipéptido) que se confiere en alrededor de una semana después de la administración de la composición.

En otra realización, la respuesta inmunitaria conferida por la composición es una respuesta inmunitaria de larga duración, es decir, dicha respuesta inmunitaria todavía se puede detectar al menos alrededor de dos meses, preferiblemente al menos 3 meses y más preferiblemente al menos 6 meses después de la administración de la composición. Cuando la respuesta inmunitaria es humoral, la respuesta de larga duración se puede mostrar mediante la detección de anticuerpos específicos, mediante cualesquiera métodos adecuados, tales como ELISA (siglas en inglés para «enzimoinmunoanálisis de adsorción»), inmunofluorescencia (IFA, por sus siglas en inglés), pruebas de neutralización por reducción de focos (FRNT, por sus siglas en inglés), inmunoprecipitación o transferencia Western.

En otra realización, independiente de la realización mencionada anteriormente, la intensidad de la respuesta inmunitaria conferida por la composición para uso según la invención depende de las dosis inyectadas de los vectores lentivíricos; cuanto más elevada es la dosis, mayor es la intensidad de la respuesta inmunitaria.

De forma interesante, dicha respuesta inmunitaria, ya sea respuesta inmunitaria temprana y/o respuesta inmunitaria de larga duración humoral o celular, se provoca después de una única administración de la composición.

Las composiciones mencionadas anteriormente se pueden inyectar en un hospedador a través de diferentes vías: inyección subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intramuscular (i.m.) o intravenosa (i.v.), administración oral o administración mucosal, especialmente, administración intranasal o inhalación. La cantidad que se administrará (dosificación) depende del sujeto al que se va a tratar, incluida la consideración de la condición del paciente, el estado del sistema inmunitario del individuo, la vía de administración y el tamaño del hospedador. Las dosificaciones adecuadas varían de 1 a 100 µg, preferiblemente 1 a 50 µg y más preferiblemente 1 a 10 µg, y las puede modificar un experto en la técnica, dependiendo de las circunstancias. Cuando se formula para inyección subcutánea, la composición inmunógena preferiblemente comprende entre 1 y 100 µg del vector lentivírico por peso corporal del hospedador, más preferiblemente, de 1 a 30 µg/dosis, especialmente, alrededor de 10 µg/dosis, en una única inyección. La dosis corresponde al contenido de antígeno p24.

El término «hospedador», tal como se usa en la presente, significa cualquier mamífero que abarca animales no humanos, incluidos primates, ratones, ratas, animales domésticos o de laboratorio o un humano. En el contexto de la presente invención, el hospedador es un ser humano.

Por lo tanto, el vector lentivírico para uso según la invención una vez que se administra al ser humano, infecta a las células del ser humano, posiblemente a células específicas, dependiendo de las proteínas de envoltura con las que se ha seudotipificado. La infección conduce a la liberación del genoma lentivírico en el citoplasma de la célula humana donde se lleva a cabo la retrotranscripción. Una vez que toma forma triple (a través de la solapa de ADN), el genoma lentivírico se importa hacia el núcleo, donde se expresa el transgén a través de la maquinaria celular. La

expresión es temporal en ausencia del origen de replicación en el genoma lentivírico, debido a la degradación del ácido nucleico y la división celular. La expresión puede ser más prolongada al proporcionar un origen de replicación que garantiza la difusión adecuada del genoma lentivírico en las células hijas después de la división celular. La estabilidad también se puede aumentar mediante la inserción de elementos MAR o SAR.

5 A pesar de la ausencia de integración del genoma lentivírico en el genoma de la célula humana, el al menos un polipéptido codificado por el transgén se expresa de manera suficiente y prolongada para que se procese, asocie con moléculas MHC y finalmente se dirija hacia la superficie celular. Dependiendo de la naturaleza del transgén, el al menos un epítipo de polipéptido asociado con la molécula MHC desencadena una respuesta inmunitaria humoral o celular.

10 Los vectores lentivíricos para uso según la invención son útiles para la profilaxis de infección por patógeno, así como de estados neoplásicos, en un hospedador.

La expresión «profilaxis de infección por patógeno» abarca el uso de un vector lentivírico para evitar la aparición de síntomas después de la contaminación o una sospecha de contaminación y/o para prevenir o reducir la infección del hospedador por dicho patógeno, particularmente un virus.

15 La expresión «estados neoplásicos» hace referencia a la proliferación celular descontrolada, incluidos tumores, que resulta del patrón de expresión génica alterado de una célula o grupo de células, o que resulta de la transformación de una célula(s) normal(es) por medio un virus tumoral, así como las consecuencias nocivas que acompañan a dichos tumores, por ejemplo, el cáncer. La «profilaxis de estados neoplásicos» abarca prevenir la proliferación celular descontrolada, el establecimiento de células tumorales o la infección o transformación de células por medio un virus tumoral.

20 El término tratamiento abarca el efecto curativo logrado por los vectores lentivíricos (destrucción del patógeno o de las células tumorales) y también el efecto beneficioso para el hospedador que se somete al tratamiento, dicho efecto se puede obtener a nivel celular o a nivel clínico, incluido como resultado, una mejora de la condición del hospedador y/o un estado de remisión o una recuperación del estado de salud. En la infección por patógeno, «tratamiento» abarca también la eliminación completa del patógeno o la imposibilidad de detectar dicho patógeno por métodos convencionales, pero también la disminución del patógeno en el hospedador o la mejora de la condición clínica del paciente. Con referencia a los estados neoplásicos, «tratamiento» abarca, además, la disminución en el tamaño y/o la cantidad de tumores en el hospedador o la mejora de la condición clínica del paciente.

30 En un aspecto específico, la composición para uso según la invención comprende, además compuestos activos adicionales útiles para la profilaxis o el tratamiento de la infección por patógeno o tumores, ya sean compuestos generales o compuestos que se ha demostrado que son activos en una infección por un patógeno específico o en cáncer de un tejido específico.

35 El vector lentivírico para uso según la invención se obtiene mediante un sistema de transcomplementación (sistema de vector/envase) al transfectar *in vitro* una célula permisiva (tal como células 293T) con un plásmido que contiene el genoma del vector lentivírico y al menos un otro plásmido que proporciona, *en trans*, las secuencias *gag*, *pol* y *env* que codifican para los polipéptidos GAG, POL y la o las proteínas de envoltura, o para una porción de estos polipéptidos, para permitir la formación de partículas retrovíricas. Como ejemplo, las células permisivas se transfectan con un primer plásmido que comprende el genoma de vector lentivírico (vector de transferencia), un segundo plásmido (plásmido de expresión de envoltura o plásmido de pseudotipificación *env*) que comprende un gen que codifica para una o unas proteínas de envoltura (tales como VSV-G) y un tercer plásmido (plásmido de encapsidación o construcción de envase) que expresa las proteínas GAG y POL.

40 La presente descripción también describe con las mismas definiciones que se proporcionaron anteriormente, un vector lentivírico que comprende una proteína integrasa defectuosa y que comprende, además, un polinucleótido que codifica para al menos un polipéptido antigénico, para producir una composición inmunógena para uso para provocar una respuesta inmunitaria contra dicho al menos un polipéptido, en un hospedador que lo necesita, así como un método para provocar una respuesta inmunitaria contra al menos un polipéptido, en un hospedador que lo necesita, que comprende administrar a dicho hospedador un vector lentivírico o una composición que comprende dicho vector lentivírico, en donde dicho vector comprende una proteína integrasa defectuosa y, además, un polinucleótido que codifica para dicho al menos un polipéptido antigénico.

#### Materiales y métodos

##### Cultivo celular y preparaciones de virus

Se cultivaron células Hela (ATCC CCL-2), células 293T humanas y células Vero de riñón de mono verde africano (ATCC CCL-81) en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal de ternero (FCS) inactivado por calor al 10 % (células Hela, células 293T) o 5 % (células Vero), penicilina, estreptomycin y Glutamax

(GIBCO). Se propagó la cepa IS-98-ST1 del virus del Nilo occidental (WNV) (número de acceso a GenBank AF 481 864), una variante estrechamente relacionada con la cepa NY99<sup>10</sup>, en monocapas de células AP61 del mosquito *Aedes pseudoscutellaris*. La purificación en gradientes de sacarosa y la titulación del virus en las células AP61 (células de *Aedes pseudoscutellaris*) mediante ensayo de inmunodetección de focos (FIA) utilizando fluido ascítico hiperinmune de ratón anti-WNV (HMAF, por sus siglas en inglés) se llevaron a cabo tal como se describió anteriormente. Los títulos de infectividad se expresaron como unidades formadoras de focos (UFF).

#### Producción de vectores lentivíricos

Los plásmidos de vector TRIP<sub>seWNV</sub> (Figura 7) y TRIP<sub>GFP</sub> se construyeron como se describió anteriormente (Iglesias et al. J. Gene Med. 2006 Mar; 8(3): 265-74). Las secuencias de nucleótidos de estos dos vectores se presentan respectivamente en las Figuras 8 y 9. Las partículas de vector se produjeron mediante cotransfección transitoria con fosfato de calcio de células 293T con el plásmido de vector pTRIP<sub>seWNV</sub> o pTRIP<sub>GFP</sub>, un plásmido de expresión de envoltura VSV-G (pHCMV-G) y un plásmido de encapsidación (p8.74 o pD64V para la producción de vectores competentes para integración o no competentes para integración, respectivamente) tal como se describió anteriormente. La cuantificación del contenido de antígeno p24 de las partículas de vector concentradas se llevó a cabo con un kit de enzimoanálisis de adsorción (ELISA) de p24 de VIH-1 comercializado (Perkin Elmer Life Sciences).

#### Preparación de CD derivadas de médula ósea

Se aislaron células de médula ósea al purgar fémures y tibias de ratones con RPMI complementado con FCS al 10 %. A continuación, se pasaron las células a través de un filtro de células de 45 µm, se centrifugaron y se volvieron a suspender en disolución de lisis IOTest® 3 (una disolución de lisis de eritrocitos, mezcla de cloruro de amonio, bicarbonato de potasio y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); Beckman Coulter) y se incubaron a 4 °C durante 5 min para lisar los eritrocitos. Las células se centrifugaron y cultivaron durante 8 días a 1x10<sup>6</sup> células/ml en medio de cultivo que consistía en RPMI con FCS al 10 %, L-glutamina, penicilina, estreptomycin, 1 mM piruvato de sodio, HEPES 10 mM y 50 µM de 2-mercaptoetanol complementado con 100 ng/ml de ligando FLT3 de ratón recombinante (R&D Systems).

#### Experimentos de transducción y análisis de citometría de flujo

Para los experimentos de transducción con células permanentes, se sembraron células Hela en placas de 48 pocillos a 40.000 células/pocillo en presencia de 8 µM de afidicolina (Sigma). Las células se transdujeron con vectores lentivíricos a una concentración que varió de 1 a 100 ng/ml, 24 horas después del bloqueo con afidicolina, que se repuso en el medio al momento de la transducción. A los 2 días después de la transducción, se cosecharon las células y se analizó la expresión de eGFP mediante citometría de flujo.

Para los experimentos de transducción en CD, se transdujeron 500.000 CD derivadas de médula ósea generadas por FLT3L (FL-CD) el día 6 de la diferenciación, con vectores lentivíricos a una concentración que varió de 50 a 300 ng/ml. A los 2 días después de la transducción, se cosecharon las FL-CD y se volvieron a suspender en PBS con FCS al 2 % y azida de sodio al 0,01 % (tampón de tinción). Las células se filtraron con un anticuerpo anti-CD11c conjugado con APC (aloficocianina) y un anticuerpo anti-B220 conjugado con PerCP (proteína clorofila peridina), se lavaron dos veces y se analizaron mediante citometría de flujo en un FACSCalibur (BD biosciences, Franklin Lakes, NJ).

#### Inmunización de ratones

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices de la Oficina para el cuidado de los animales de laboratorio del Instituto Pasteur. Se inocularon por vía intraperitoneal (i.p.) a ratones C57/B16 de seis semanas dosis variables de las partículas de vector TRIP/sE WNV (de 1 a 100 ng/ml) en 0,1 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS; pH 7,5) complementada con seroalbúmina bovina al 0,2 % tamponada (DPBS/0,2 % BSA, Sigma).

#### Medición de las respuestas de anticuerpo en suero

Se extrajo sangre de los ratones por vía periorbital y las muestras de suero se inactivaron por calor 30 min a 56 °C. Los anticuerpos anti-WNV se detectaron mediante ELISA, por medio del uso de placas de microtitulación recubiertas con WNV IS-98-ST1 purificada con sacarosa. Se utilizó la inmunoglobulina anti-ratón de cabra peroxidasa (H+L) (Jackson Immuno Research) en una dilución 1:4.000 como anticuerpo secundario. El título como criterio de valoración se calculó como la recíproca de la última dilución que provocó el doble de la densidad óptica (DO) del suero de ratones no inmunizados.

#### Exposición a WNV

La exposición a WNV se llevó a cabo mediante inoculación i.p. de la cepa neurovirulenta de WNV IS-98-ST1 (DL50 i.p. = 10 UFF) tal como se describió anteriormente, una semana o dos meses después de la vacunación con el vector lentivírico. Los ratones expuestos se monitorizaron diariamente para determinar signos de morbilidad o mortalidad, durante hasta 21 días después de la inoculación de la cepa de WNV.

## 5 Resultados

La transducción de células permanentes con vectores TRIP no competentes para la integración resulta en niveles de expresión del transgén elevados

Para evaluar la hipótesis de que los VL no competentes para la integración (vectores TRIP.NI) podrían ser herramientas útiles para suministrar antígenos (Ag) a APC permanentes tales como CD, inicialmente evaluamos su eficacia de transducción en células con crecimiento inhibido. Con este fin, se trataron células HeLa con afidicolina, un inhibidor específico del ciclo celular, se expusieron a dosis escalonadas de partículas de TRIP.NI o TRIP.I que codificaban para eGFP. La eficacia de la transducción se determinó, a continuación, por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 1 (panel superior), los vectores TRIP.NI transdujeron las células permanentes con eficacia elevada en de manera dependiente de la dosis. Asimismo, el análisis del porcentaje de células positivas para eGFP reveló diferencias mínimas en las capacidades de transducción de los vectores TRIP.NI en comparación con los vectores TRIP.I. La transducción con partículas de TRIP.NI proporcionó también niveles elevados de expresión del transgén (Figura 1, panel inferior), aunque significativamente más bajos por un factor de 2 en comparación con las células transducidas con TRIP.I.

La transducción del vector lentivírico que no se integra TRIP conduce a una expresión de antígeno eficaz en células dendríticas convencionales y plasmocitoides.

A continuación, estudiamos la capacidad de los vectores TRIP.NI para transducir CD. Las CD se clasifican en convencionales (CDc) ( $CD11c^+B220^-$ ) y plasmocitoides (CDp) ( $CD11c^+B220^+$ ) y estos dos subtipos de CD son capaces de estimular respuestas inmunitarias específicas para Ag. A continuación, investigamos la transducción de CD derivadas de la médula ósea diferenciadas en presencia de Flt3L (FL-CD), que permite la generación de grandes cantidades de CDp y CDc. Las FL-CD se expusieron a dosis escalonadas de partículas de TRIP.NI<sub>GFP</sub> o TRIP.I<sub>GFP</sub>. Como se muestra en la Figura 2A, ambos vectores TRIP.I y TRIP.NI fueron capaces de transducir las FL-DC con máxima eficacia de transducción de 60 % y 56 %, respectivamente. De forma interesante, observamos que la transducción con partículas de TRIP.I conduce a una pequeña proporción de CD que expresa niveles elevados de eGFP, mientras que los experimentos de transducción con TRIP.NI no (véase la presencia de puntos en la esquina superior derecha de la transferencia puntual, en experimentos donde las células han sido transducidas con vectores lentivíricos de la invención en comparación con vectores IC). Para descartar la posibilidad de pseudotransducción conferida por proteínas eGFP residuales que hayan contaminado el concentrado de vector, también evaluamos el porcentaje de CD transducidas después de la exposición a las partículas enviadas antes del tratamiento con calor, que se ha demostrado que anula las capacidades de transducción del VL en diferentes tipos de células. Como se esperaba, el tratamiento con calor redujo drásticamente el porcentaje de células positivas para eGFP (Figura 2A).

A continuación, separamos células dendríticas  $CD11c^+B220^+$  y células dendríticas  $CD11c^+B220^-$  para evaluar la capacidad del VL para transducir cada subconjunto de CD. Como se muestra en la Figura 2B, no solo las CDc derivadas de FL sino también las CDp derivadas de FL se pudieron transducir de forma eficaz con VL, independientemente de su competencia para la integración.

La eficacia de transducción con partículas de TRIP.NI fue dependiente de la dosis y ligeramente, pero de forma insignificante, más baja que la obtenida con las partículas de TRIP.I. De forma interesante, observamos que la transducción con vectores TRIP.I condujo a que una pequeña proporción de CD expresaran niveles elevados del transgén, mientras que la exposición de las CD a vectores de TRIP.NI no (Fig. 2A). Esta población celular que se observó solo en los experimentos de transducción con vectores TRIP.I podría ser la consecuencia de integraciones de múltiples vectores o de la integración del vector en regiones de transcripción activas del genoma.

Los vectores lentivíricos no competentes para la integración TRIP indujeron la producción de anticuerpos específicos para Ag

Al tomar en cuenta que TRIP.NI podría suministrar de forma eficaz un gen extraño a CD, a continuación, exploramos su capacidad para producir una respuesta inmunitaria específica. En un estudio reciente, diseñamos vectores TRIP.I que codifican para una forma secretada de la envoltura de WNV (TRIP.I E<sub>WNV</sub>) que posee epítomos neutralizantes y hemos demostrado que TRIP.I E<sub>WNV</sub> podría estimular una inmunidad protectora basada en anticuerpos en un modelo de ratón de la infección por WNV. Para investigar la capacidad de los vectores TRIP.NI para iniciar una respuesta de linfocitos B, se inmunizaron animales con diversas dosis de partículas de TRIP.NI E<sub>WNV</sub> que variaron de 1 a 100 ng de antígeno p24 por ratón. Como testigo, se inocularon ratones con 100ng de partículas de TRIP.NI E<sub>WNV</sub> inactivadas por calor (IC) para anular sus capacidades de transducción. Tres semanas después de la inmunización, se extrajo sangre de los ratones por vía periorbital y el suero individual o combinado se evaluó mediante ELISA para determinar los anticuerpos anti-WNV totales. Como se esperaba, las inmunizaciones con los

vectores TRIP.NI E<sub>WNV</sub> inactivados por calor no condujeron a una producción posterior de Abs (Fig.3A). En cambio, los ratones inmunizados con una dosis tan baja como de 10 ng de vectores TRIP.NI E<sub>WNV</sub> exhibieron niveles detectables de anticuerpos anti-WNV y las inmunizaciones con 100 ng de sE-LVNI indujeron una secreción masiva de Ig anti-WNV con una media de título que alcanzó  $8 \times 10^4$ .

5 A continuación, comparamos la intensidad de la respuesta inmunitaria provocada por los vectores TRIP.NI E<sub>WNV</sub> y TRIP.I E<sub>WNV</sub>. Como se muestra en la Fig. 3B, la vacunación con TRIP.I E<sub>WNV</sub> a una dosis tan baja como de 3ng de partículas generó una secreción muy elevada de anticuerpos anti-WNV y los títulos fueron relativamente constantes dentro del intervalo de dosis de inmunización de 3 a 100ng, sin evidencia de respuesta a la dosis. En cambio, y en  
10 contra de todas las expectativas, los títulos en sueros de ratones inmunizados con vectores TRIP.NI E<sub>WNV</sub> fueron proporcionales a la dosis de partículas inyectada. Aunque los vectores TRIP.I provocaron una respuesta inmunitaria más elevada que los vectores TRIP.NI con dosis inferiores a 30ng, las vacunaciones con 100 ng de cualquiera de los vectores condujeron a una respuesta equivalente.

Estos resultados, tomados en conjunto, demuestran que una única inmunización con vectores TRIP.NI fue suficiente para provocar una respuesta inmunitaria específica humoral con una intensidad comparable a la obtenida con vectores TRIP.I, por encima de una dosis umbral de partículas. De forma interesante y sorprendente, el uso de  
15 vectores no competentes para la integración permitió obtener una respuesta inmunitaria cuya intensidad depende de la dosis de vectores lentivíricos inyectada.

Las inmunizaciones de ratones con una única dosis de TRIP.NisE<sub>wnv</sub> proporcionan los siguientes títulos de anticuerpos:

Dosis	Título de anticuerpo específico para WNV (D. O.)
IC NI 100	0
NI 1	0
NI 3	0
NI 10	152
NI 30	569
NI 100	83000

20 Como se muestra en la Figura 3A, se obtiene una secreción potente de anticuerpos específicos para WNV con una media de título que alcanza  $8 \times 10^4$  con una dosis de 100ng de antígeno p24. A esta dosis, las inmunizaciones con TRIP.NI condujeron a una respuesta equivalente a la obtenida con TRIP.I. Sin embargo, los experimentos de respuesta a la dosis revelaron que la dosis mínima necesaria para la inducción de una respuesta de linfocitos B fue más baja con partículas de TRIP.I en comparación con partículas de TRIP.NI. Una posible explicación para este  
25 resultado podría relacionarse con la capacidad de los vectores TRIP.I para generar CD con una expresión muy elevada de Ag dado que, en teoría, los niveles de expresión elevados de Ag en CD podrían favorecer una presentación más constante de péptidos antigénicos y, por lo tanto, podría explicar por qué dosis bajas de partículas de TRIP.I fueron suficientes para provocar una respuesta inmunitaria específica. Esta hipótesis también puede explicar la no linealidad de la producción de anticuerpos para WNV observada en los experimentos de inmunización  
30 de respuesta a la dosis con vectores TRIP.I (Fig.3B). De hecho, los experimentos de respuesta a la dosis *in vitro* que se llevaron a cabo con CD revelaron que la aparición de CD con niveles de expresión muy elevados de Ag no parecía estar correlacionada con la dosis de partículas de TRIP.I (Fig.2A). Por lo tanto, la capacidad para generar CD con niveles muy elevados de Ag puede contribuir a explicar las diferencias observadas entre TRIP.I y TRIP.NI con dosis bajas de las partículas inyectadas. Otra posibilidad está ligada al hecho de que el VL seudotipificado VSV-G tenga un vasto tropismo celular y, por consiguiente, pueda transducir en el sitio de la inyección otros tipos de células además de CD, incluidas células divisibles. Esto podría resultar en una expresión más constante de Ag en  
35 experimentos de vacunación con partículas de TRIP.I. Qué tipos de células se transducen después de inyecciones *in vivo* de VL y en qué medida participan en la magnitud de la respuesta inmunitaria provocada por los vectores TRIP.I y TRIP.NI es el objeto de la investigación en curso.

40 La inmunización con vectores TRIP.NI E<sub>WNV</sub> confiere protección temprana contra la exposición a WNV

Hemos demostrado previamente que TRIP.I E<sub>WNV</sub> confiere una inmunidad protectora temprana contra una exposición a WNV. Para determinar si la respuesta inmunitaria provocada por vectores TRIP.NI podría conducir

también a una protección rápida, se inmunizaron ratones con 100 ng de partículas de TRIP.NI E<sub>WNV</sub> y se expusieron 7 días después a 10.000 UFF de la cepa de WNV IS-98-ST1 extremadamente virulenta (mil veces la dosis requerida para matar al 50 % de los animales infectados). También incluimos en este experimento de exposición un grupo de ratones inmunizados con 100 ng de TRIP.I E<sub>WNV</sub> como testigo positivo de la protección y otro grupo de ratones inoculados con D-PBS como testigo negativo. Como se esperaba, todos los ratones que recibieron D-PBS murieron 12 días después de la exposición (Fig. 4). En cambio, todos los ratones inmunizados con una única dosis de TRIP.NI E<sub>WNV</sub> estuvieron protegidos contra la exposición, así como también los ratones inmunizados con TRIP.I E<sub>WNV</sub>. Los ratones protegidos contra la exposición a WNV no desarrollaron indicaciones clínicas de enfermedad durante el período de observación de 3 semanas después de la exposición. Estos resultados demostraron que se logró una inmunidad protectora temprana contra WNV con una sola administración de TRIP. E<sub>WNV</sub> defectuoso para integración.

TRIP.NI E<sub>WNV</sub> induce una protección de larga duración

Como se demostró anteriormente, la inmunización de ratones con TRIP.I E<sub>WNV</sub> resultó en el establecimiento de una inmunidad protectora de larga duración contra la exposición a WNV. Para evaluar la duración de la inmunidad protectora provocada por TRIP.NI E<sub>WNV</sub> y la dosis mínima de partículas necesaria para inducir una protección de larga duración, se inmunizaron ratones con diferentes cantidades de partículas (1, 3, 10, 30 y 100 ng de antígeno p24) y se expusieron después de un período de espera de 2 meses después de la inmunización. Como se muestra en la Figura 1A, hubo una relación dependiente de la dosis entre la dosis de partículas de TRIP.NI E<sub>WNV</sub> administrada y el grado de protección, donde se logró una protección completa con una dosis de 100 ng de partículas de vacuna inyectadas.

Por lo tanto, los vectores TRIP.NI E<sub>WNV</sub> indujeron inmunidad de larga duración contra la infección por WNV.

#### Discusión

Como resultado importante de los presentes experimentos se encuentra la demostración de que la vacunación con partículas de TRIP.NI puede proporcionar una respuesta inmunitaria eficaz e intensa que es una respuesta inmunitaria temprana y de larga duración, y además dependiente de la dosis para antígenos, a pesar de la ausencia de integración del genoma lentivírico administrado. Por lo tanto, se demostró una protección completa contra una exposición a una dosis letal de WNV.

Como se esperaba, la inmunidad protectora de memoria se correlacionó directamente con el título de anticuerpos anti-WNV inducidos por las partículas de TRIP.NI (Fig. 3 y Fig. 5). De hecho, está establecido que la inmunidad humoral es un componente esencial para el establecimiento de una inmunidad protectora completa contra WNV, dado que los anticuerpos específicos limitan la diseminación de la infección. De forma enigmática, las partículas de TRIP.NI inactivadas por calor, así como las partículas IC-TRIP.I fueron capaces de conferir una protección parcial (30 %) contra la exposición a WNV (no se muestran los datos), aunque no se detectaron anticuerpos para WNV en los sueros de los animales 3 semanas después de la inyección de partículas de IC-TRIP (Fig. 3A, B). Esto sugiere que la inmunidad celular también podría tener un rol en el establecimiento de la protección contra WNV. En consonancia con esta hipótesis, los ratones que carecían de células CD8<sup>+</sup> exhibieron una mortalidad aumentada después de la infección por WNV (Shoresta and Diamonds, datos no publicados). Asimismo, se han definidos epítomos de linfocitos T citotóxicos en el dominio III de la envoltura de diversos flavivirus. Se necesitan trabajos adicionales para aclarar la contribución relativa de las respuestas de CTL a la protección a largo plazo conferida por las vacunas de TRIP.NI y TRIP.I. Además, también se necesitan estudios adicionales para definir los mecanismos moleculares que permiten el ingreso de las partículas de IC-TRIP en CD dado que el tratamiento con calor desnaturaliza la envoltura de VSV-G y se ha demostrado que anula las capacidades de transducción del VL en diferentes líneas celulares. Sin embargo, resulta tentador especular que, en vista de las capacidades de internalización excepcionales de las CD, una fracción de las partículas de IC TRIP podrían incorporarse en las CD mediante un mecanismo independiente de VSV-G, que permite una expresión baja para suficiente de Ag para explicar la protección parcial conferida por las partículas de IC-TRIP.

Los experimentos de exposición cinética en ratones vacunados revelaron que las vacunas de TRIP.NI no solo confirieron una inmunidad protectora a largo plazo, sino que también provocaron protección tan temprano como una semana después de una única inyección de las partículas. Aunque no se entienden completamente los mecanismos exactos implicados en esta protección temprana, hemos detectados anticuerpos específicos para WNV una semana después de las inmunizaciones con partículas de TRIP.NI y TRIP.I. Hemos demostrado previamente que esta ola temprana de anticuerpos estaba compuesta exclusivamente por IgM específica, derivada de ratones 4 días después de la infección, protegiendo completamente a los ratones contra la infección por WNV.

En nuestro estudio, un régimen de vacunación basado en una inyección directa de una única dosis de partículas de TRIP.NI provocó una respuesta inmunitaria específica robusta, rápida y a largo plazo, logrando una protección completa contra WNV. Por lo tanto, la estrategia de vacuna basada en TRIP.NI representa una plataforma segura y eficaz para el desarrollo de vacunas contra agentes patógenos tales como flavivirus que requieren inmunidad de linfocitos B.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH que no se integra que comprende una proteína integrasa defectuosa y que comprende, además, un genoma de ARN que es el producto de transcripción de un genoma de vector que comprende un polinucleótido que codifica para al menos un polipéptido antigénico, dos LTR y una solapa de ADN que comprende los dominios cPPT y CTS, en la fabricación de una composición inmunógena para provocar una respuesta inmunitaria protectora contra dicho al menos un polipéptido antigénico para prevenir la infección por un patógeno o estados neoplásicos, en un ser humano al que se administra dicha composición inmunógena que comprende dosis de dicho vector lentivírico de VIH que varían de 1 µg a 100 µg de antígeno p24, en el que dicha proteína integrasa defectuosa es una integrasa que tiene una mutación clase I para alterar específicamente su actividad de integrasa.
- 10 2. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según la reivindicación 1, en el que dicho vector lentivírico es no replicativo.
3. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humoral protectora.
- 15 4. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria celular.
5. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según la reivindicación 4, en el que dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria celular mediada por CD8.
- 20 6. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según la reivindicación 4, en el que dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria celular mediada por CD4.
7. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según la reivindicación 1, en el que dicha mutación es D64V.
8. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el genoma lentivírico carece de los genes lentivíricos gag, pol y/o env.
- 25 9. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el genoma lentivírico carece de los genes lentivíricos funcionales gag, pol y/o env.
10. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el genoma lentivírico carece de todas las secuencias lentivíricas codificantes endógenas.
- 30 11. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el genoma lentivírico comprende (a) una LTR5' y una LTR3', (b) una secuencia psi, (c) una solapa de ADN que comprende los dominios cPPT y CTS y (d) una secuencia que codifica para dicho al menos un polipéptido.
12. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según la reivindicación 11, en el que dicho genoma lentivírico comprende, además, un sitio donador de empalme (SD) y un sitio aceptor de empalme (SA) y un elemento sensible a Rev (RRE).
- 35 13. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según la reivindicación 11 a 12, en el que dicho genoma lentivírico comprende, además, un origen de replicación (ori).
14. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicho genoma lentivírico comprende, además, una región de acoplamiento de supercóntigo (SAR) y/o una región de acoplamiento de matriz (MAR).
- 40 15. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la LTR se suprime para el promotor y el potenciador de U3.
16. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la solapa de ADN comprende o consiste en las secuencias según se definen en SEQ ID N.º: 1 a 7, como se representan en la Figura 6.
- 45 17. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que dicho al menos un polipéptido se codifica mediante una secuencia originada a partir del genoma de un patógeno.
18. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según la reivindicación 17, en el que dicho patógeno, es un virus, especialmente retrovirus, lentivirus, flavivirus o coronavirus, una bacteria o un parásito.

19. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según la reivindicación 18, en el que dicho al menos un polipéptido se deriva de la envoltura de virus del SIDA, incluidos VIH-1 o VIH-2, de la cápside del VIH o de la envoltura del virus de la fiebre amarilla, del virus del Nilo occidental, el virus del Dengue (DV), el virus de la encefalitis japonesa (JEV) o el coronavirus asociado a SARS.
- 5 20. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que dicho al menos un polipéptido comprende un epítipo o antígeno tumoral.
21. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que dicho vector lentivírico se pseudotipifica con una proteína VSV-G.
- 10 22. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en el que dicha proteína VSV-G comprende o consiste en el dominio transmembranario de VSV-G Indiana y el ectodominio del serotipo New-Jersey.
23. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria temprana.
- 15 24. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según la reivindicación 23, en el que dicha respuesta inmunitaria se induce tan pronto como una semana después de la administración de la composición.
25. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en el que dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria de larga duración.
26. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según la reivindicación 25, en el que dicha respuesta inmunitaria todavía es protectora al menos dos meses después de la administración de la composición.
- 20 27. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en el que dicha respuesta inmunitaria en dicho hospedador se alcanza con una única administración.
28. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, que se administra en dosis de dicho vector lentivírico de VIH que varían de 1 a 50µg, más preferiblemente, 1 a 10 µg.
- 25 29. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en el que dicha composición se administra mediante una inyección subcutánea (s.c.), intradérmica (i.d.), intramuscular (i.m.) o intravenosa (i.v.), una administración oral y una administración mucosal, especialmente administración intranasal o inhalación.
30. Uso de una partícula de vector lentivírico de VIH según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, para prevenir la infección del hospedador por un patógeno tal como un virus, una bacteria o un parásito.



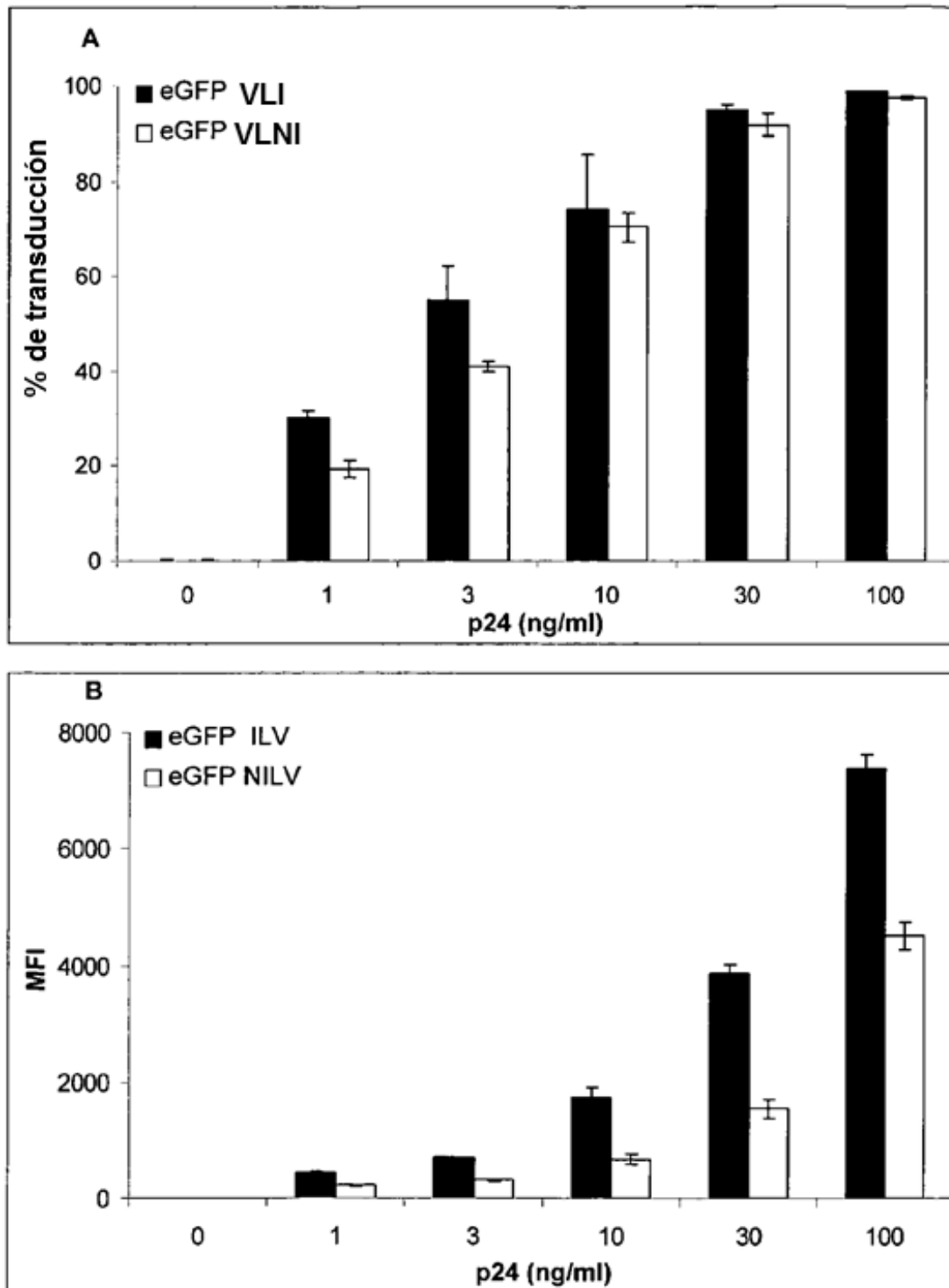
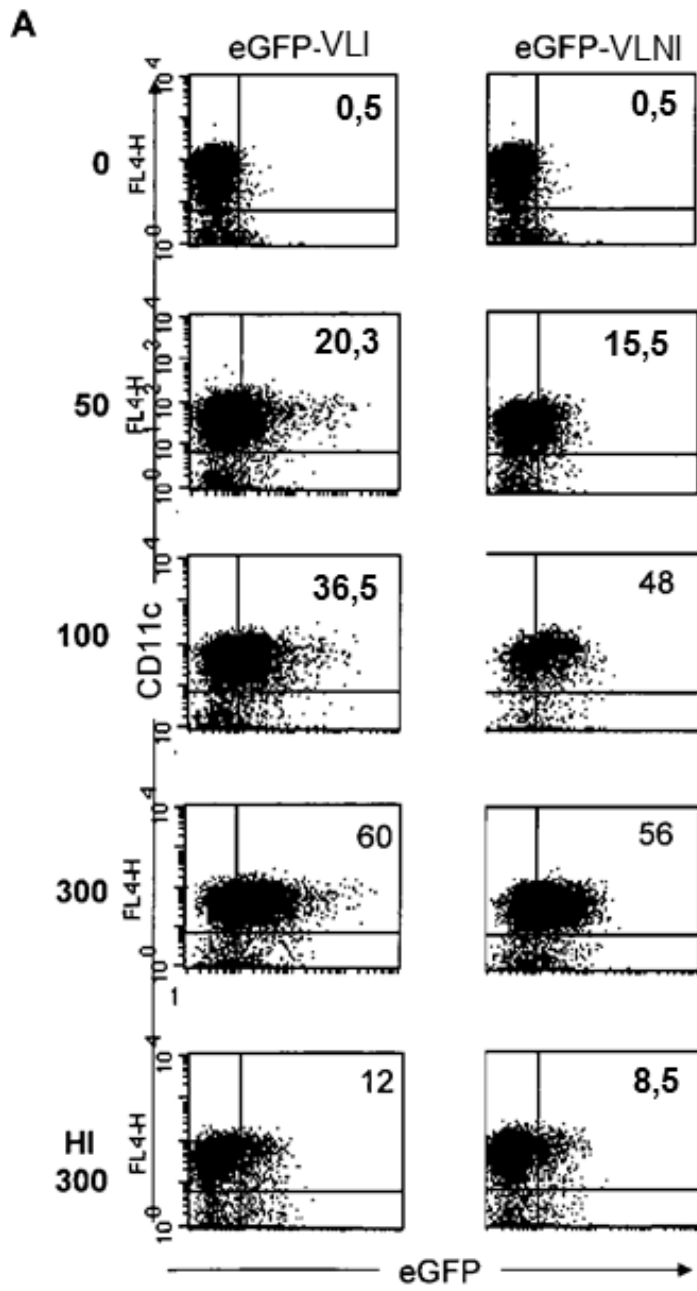
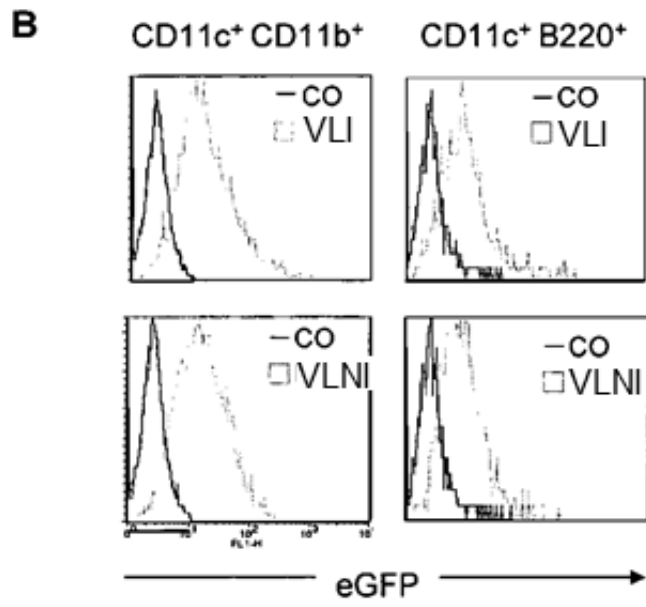


Fig. 1



**Fig. 2**



**Fig. 2**

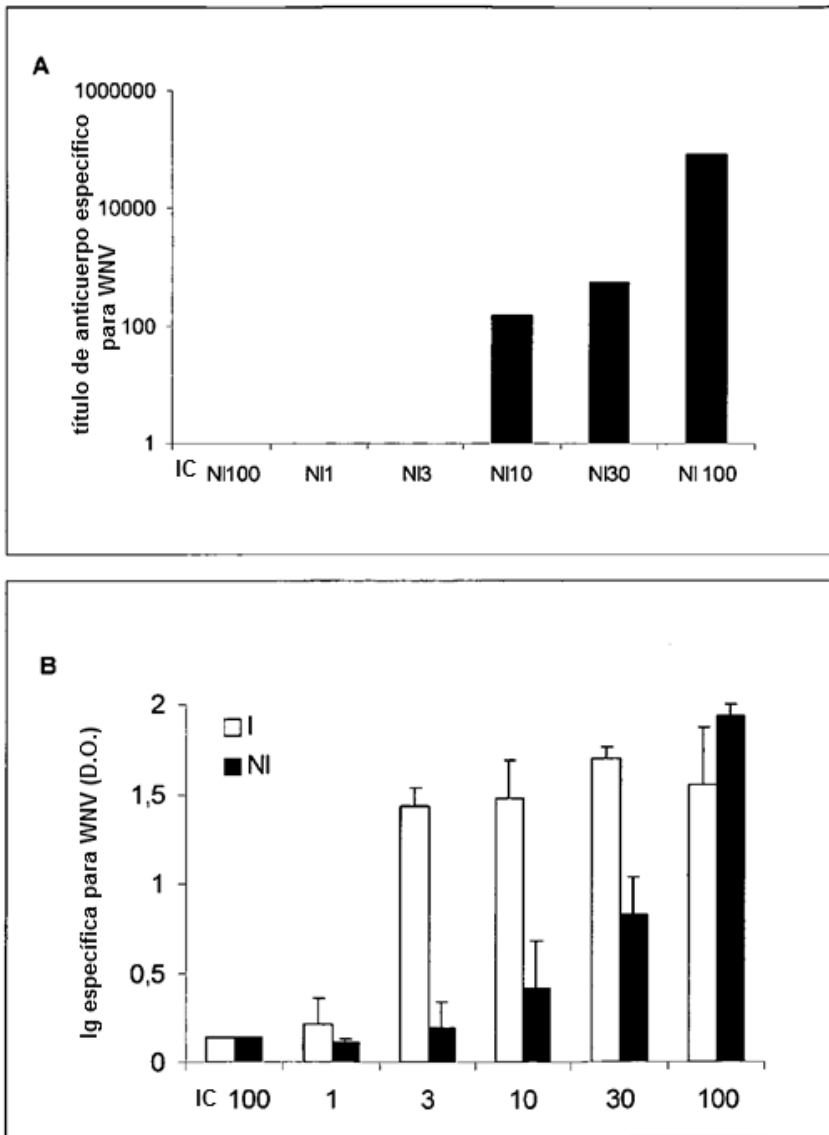
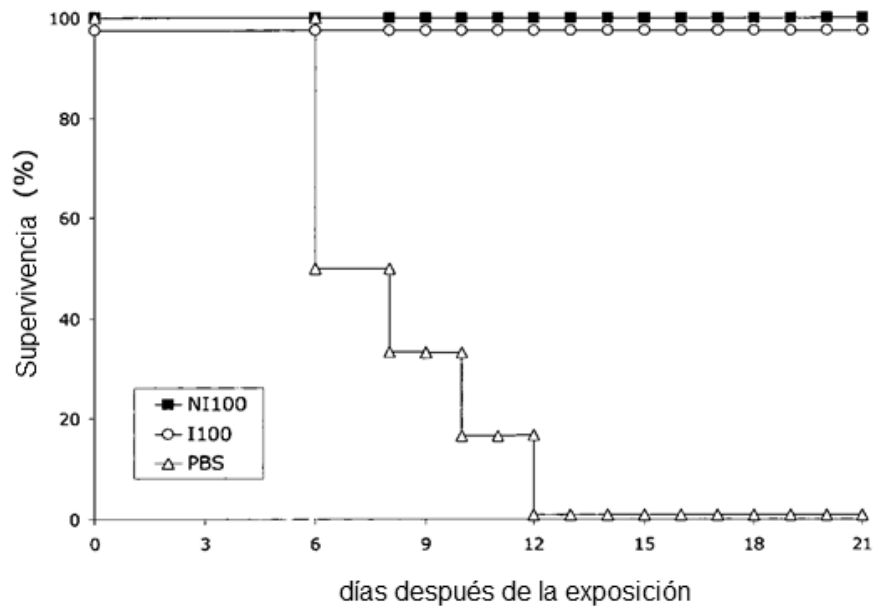


Fig. 3



**Fig. 4**

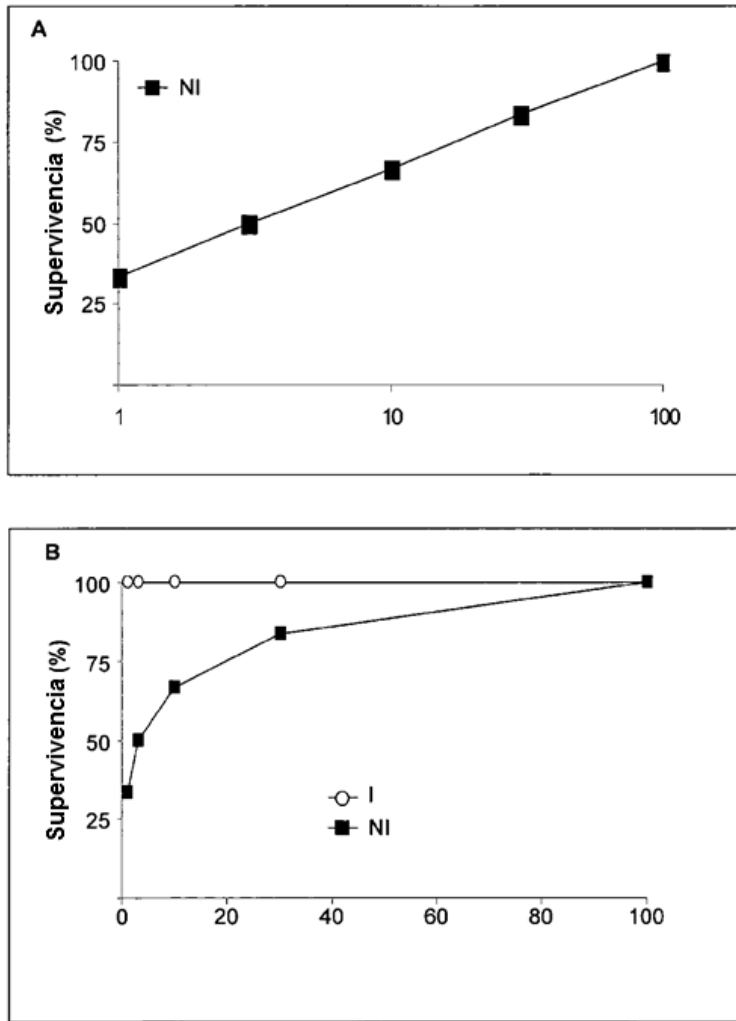


Fig. 5

**CAEV**

GTTCCAG CCACAATTTGTTCGC TGTA GAA TCAGCCA TAGCAGCAGCCCTA GTCGC  
 CATAAAT ATAAAAAGAAAGGG TGGG CTGGGGACAA GCCCTATGGATATT TTTAT  
 ATATAAT AAAGAACAGAAAAG AATAAATAATAAAT ATAA TAAAAATTCT CAAAA  
 AATTCAA TTCTGTTATTACAG AATAAGGAAAAGAG GAC (SEQ ID NO:1)

**EIAV**

CTTGTA CAAA GGGAGGGAAA GTATGGGAGGACAG ACAC CATGGGAAGT ATTTA  
 TCACTAA TCAAGCA CAAGTAA TACA TGAGAACTT TTAC TACAGCAAGC ACAA T  
 CCTCCAA AAAA TTTTGT TTTT ACAA ATCCCTGGT GAACATGATTGGAA GGGAC  
 CTACTAG GGTG CTGTGGAAGG GTGA TGGTGCAGTA GTA (SEQ ID NO:2)

**VISNA**

GGACCCT CATTACTCTAAATA TAAAAGAAAGGGT GGGCTAGGGACAAG CCCTA  
 TGGATAT ATTTATA TTTAATA AGGAACAACAAAGA ATACAGCAACAAAG TAAAT  
 CAAAACA AGAAAAAATTCGAT TTTGTTA TTACAGA ACAA GAAAAAGAGG GCATC  
 CAGGAGA GTGGCAAGGACCAA CACAGGTACTTTGG GGC (SEQ ID NO:3)

**SIV<sub>AGM</sub>**

TACTGAT GGCTTGCATACTTC ACAA TTTTAAAAGA AAGGGAGGAATAGG GGGAC  
 AGACTTC AGCAGAGAGACTAA TTAA TATAATAACA ACACAATTAGAAAT ACAAC  
 ATTTACA AACCAAATTCAAA AAATTTTAAATTTT AGAGTCTACTACAG AGAAG  
 GGAGAGA CCCTGTGTGGAAG GACCGGCACAATTA ATC (SEQ ID NO:4)

**HIV-2 ROD**

TGCATGA ATTTTAAAAGAAGG GGGG GAA TAGGGGA TATGACTCCATCAG AAAGA  
 TTAATCA ATATGATCACCACA GAACAAGAGATACA ATTC CTC CAAGCCA AAAAT  
 TCAAAAT TAAAAGATTTTCGG GTCTATTTTCAGAGA AGGCAGAGATCAGT TGTGG  
 AAAGGAC CTGGGGA ACTACTG TGGAAAGGAGAAGG AGC (SEQ ID NO:5)

**HIV-1 LAI**

CAGTATT CATC CACAATTTTA AAAGAAAAGGGGGG ATTGGGGGTACAG TGCAG  
 GGGAAAG AATAGTAGACATAA TAGCAACAGACATA CAAA CTAAGAATT ACAAA  
 AACAAAT TACAAAATTCAAA ATTTTCGGGTTTAT TACAGGGACAGCAG AGATC  
 CACTTTG GAAAGGACCAGCAA AGCTCCTCTGGAAA GGT (SEQ ID NO:6)

**HIV1**

TTTTAAA AGAAAAGGGGGGAT TGGGGGGTACAGTG CAGGGGAAAGAATA GTAGA  
 CATAATA GCAACAGACATACA AACTAAAGAATTAC AAAAACAAATTACA AAAAT  
 TCAAAATTTTC (SEQ ID NO:7)

**Fig. 6**

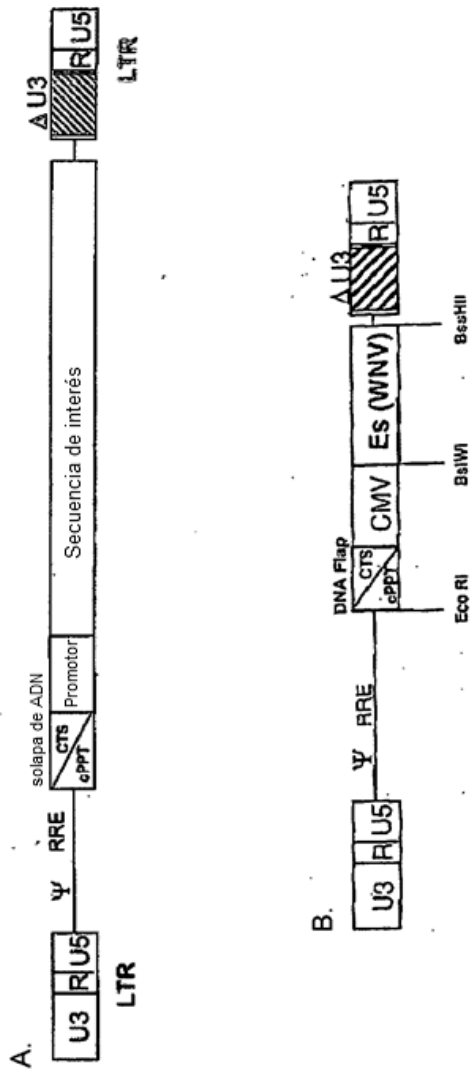


Fig. 7



TGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGG  
 ATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTAGCAGAACTACACACCAGG  
 GCCAGGGATCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTAC  
 CAGTTGAGCCAGAGAAGTTAGAAGAAGCCAACAAAGGAGAGAACCACAGC  
 TTGTTACAACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGT  
 GTTAGAGTGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATCACGGTGGCCCGA  
 GAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAAGTCTGATATCGAGCTTGCTACAA  
 GGGACTTCCGCTGGGGACTTCCAGGGAGGCGTGGCCTGGGCGGGACT  
 GGGGAGTGGCGAGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTCCT  
 GTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGC  
 TAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCTTGACTGCT  
 TCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCC  
 TCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACA  
 GGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTGACGCAGGACT  
 CGCCTTGCTGAAGCGCGGAATTCGCGCCACGGCAAGAGGCGAGGGCGG  
 CGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAG  
 AGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAAATTAGATCGCGAT  
 GGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGAAAGAAAAAATAAAATTAATA  
 CATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGG  
 CCTGTTAGAAAATCAGAAAGGCTGTAGACAAATACTGGACAGCTACAAC  
 CATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTA  
 GCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACCCAAGGA  
 AGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCAC  
 AGCAAGCCGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAA  
 TTGGAGAAGTGAATTATATAAAATATAAAGTAGTAAAAATTAACCATTAG  
 GAGTAGCACCCACCAAGGCAAGAGAGAGAGTGGTGACAGAGAGAAAAAGA  
 GCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCCCTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAG  
 CACTATGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTAT  
 TGTCTGTATATAGTGCAGCAGCAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCG  
 CAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGC  
 AAGAATCCTGGCTGTGGAAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGA  
 TTTGGGGTTGCTCTGGAAAACCTCATTGCAACCACTGCTGTGCCTTGAAT  
 GCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTG  
 GATGGAGTGGGACAGAGAAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCT  
 TAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAAATGAACAAGAATTATTG  
 GAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAAACATAACAAATTG  
 GCTGTGGTATATAAAAATTATTATAATGATAGTAGGAGCTTGGTAGGTT  
 TAAGAATAGTTTTTGTGCTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGA  
 TATTCACCATATATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGA  
 CAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGAT  
 CCATTGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGCCGAATTCACAAATGG  
 CAGTATTCATCCACAAATTTTaaaagaaaaggggggATTGGGGGTACAGT  
GCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAATAAAGA  
ATTACAAAACAAATTAcaaaaattcaaaattttCGGGTTTATTACAGGG  
 ACAGCAGAGATCCACTTTGGGGCGATAAGCTTGGGAGTTCCGCGTTACAT  
 AACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCA

Figura 8A

TTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTT  
 CCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAG  
 TACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGAC  
 GGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTT  
 TCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA  
 TCGGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGG  
 GGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTGGCA  
 CCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGA  
 CGAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT  
 CGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGA  
 CCTCCATAGAAGACACCGACTCTAGAggaCGTACGATGAGAGTTGTGTTT  
**GTCGTGCTATTGCTTTTGGTGGCCCCAGCTTACAGCTTCAACTGCCTTGG**  
**AATGAGCAACAGAGACTTCTTGGAAAGGAGTGTCTGGAGCAACATGGGTGG**  
**ATTTGGTTCTCGAAGGCGACAGCTGCGTACTATCATGTCTAAGGACAAG**  
**CCTACCATCGATGTGAAGATGATGAATATGGAGGCGGTCAACCTGGCAGA**  
**GGTCCGAGTTATTGCTATTTGGCTACCGTCAGCGATCTCTCCACCAAAG**  
**CTGCGTGCCCGACCATGGGAGAAGCTCACAATGACAAACGTGCTGACCCA**  
**GCTTTTGTGTGCAGACAAGGAGTGGTGGACAGGGGCTGGGGCAACGGCTG**  
**CGGATTATTTGGCAAAGGAAGCATTGACACATGCGCCAAATTTGCCTGCT**  
**CTACCAAGGCAATAGGAAGAACCATCTTGAAGAGAATATCAAGTACGAA**  
**GTGGCCATTTTTGTCCATGGACCAACTACTGTGGAGTCGCACGGAAACTA**  
**CTCCACACAGGTTGGAGCCACTCAGGCAGGGAGATTGAGCATCACTCCTG**  
**CGGGCCCTTCATACACACTAAAGCTTGGAGAATATGGAGAGGTGACAGTG**  
**GACTGTGAACCACGGTCAGGGATTGACACCAATGCATACTACGTGATGAC**  
**TGTTGGAAACAAAGACGTTCTTGGTCCATCGTGAGTGGTTCATGGACCTCA**  
**ACCTCCCTTGGAGCAGTCTGGAAGTACTGTGTGGAGGAACAGAGAGACG**  
**TTAATGGAGTTTGGAGAACCCACACGCCACGAAGCAGTCTGTGATAGCATT**  
**GGGCTCAAGAGGGAGCTCTGCATCAAGCTTTGGCTGGAGCCATTCTG**  
**TGGAATTTCAAGCAACACTGTCAAGTTGACGTCGGGTCAATTTGAAGTGT**  
**AGAGTGAAGATGGAAAAATTGCAGTTGAAGGGAACAACCTATGGCGTCTG**  
**TTCAAAGGCTTTCAAGTTTCTTGGGACTCCCGCAGACACAGGTACGGCA**  
**CTGTGGTGTGGAAATGACAGTACACTGGCACGGATGGACCTTGCAAAGTT**  
**CCTATCTCGTCAGTGGCTTCAATGAACGACCTAACGCCAGTGGGCAGATT**  
**GGTCACTGTCAACCCTTTTGTTCAGTGGCCACGGCCAACGCTAAGGTCC**  
**TGATTGAATTGGAACCACCCTTTGGAGACTCATACATAGTGGTGGGCAGA**  
**GGAGAACAACAGATCAATCACCATTGGCACAAGTCTGGAAGCAGCATTGG**  
**CAAAGCCTTTACAACCACCCTCAAAGGAGCGCAGAGACTAGCCGCTCTAG**  
**GAGACACAGCTTGGGACTTTGGATCAGTTGGAGGGGTGTTACCTCAGTT**  
**GGGAAGGCTGtetaatgcegcgcGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAG**  
**GCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGACTGGAAGG**  
**GCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGatcgtegagAGATGCTGCATATAA**  
**GCAGCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAG**  
**CCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAA**  
**AGCTTGCCCTGAGTGTCTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTC**  
**TGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTA**  
**GCAGT**

Figura 8B

TGGAAGGGCTAATTCACTCCCAACGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGG  
 ATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTAGCAGAATAACACACCAGG  
 GCCAGGGATCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTAC  
 CAGTTGAGCCAGAGAAGTTAGAAGAAGCCAACAAAGGAGAGAACCACAGC  
 TTGTTACAACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGT  
 GTTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTAGCATTTCATCACGGTGGCCCGA  
 GAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAAGTGTGATATCGAGCTTGCTACAA  
 GGGACTTTCCGCTGGGGGACTTCCAGGGAGGCGTGGCCTGGGCGGGACT  
 GGGGAGTGGCGAGCCCTCAGATCCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCCT  
 GTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGC  
 TAACTAGGGAACCCACTGCTTAAAGCCTCAATAAAGCTTGCCCTTGAGTGCT  
 TCAAGTAGTGTGTCCCGTCTGTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCC  
 TCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACA  
 GGGACTTGAAAGCGAAAGGGAAACCAGAGGAGCTCTCTCGACGCAGGACT  
 CGGCTTGCTGAAGCGGCACGGCAAGAGGCGAGGGGCGGCGACTGGTGAG  
 TACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCG  
 AGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAATT  
 CGGTTAAGGCCAGGGGAAAGAAAAATATAAATTAACAATATAGTATG  
 GGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAA  
 CATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAG  
 ACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTA  
 TTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACA  
 AGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCC  
 GCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAATTGGAGAAGTG  
 AATTATATAAATAATAAGTAGTAAAAATGAACCATTAGGAGTAGCACCC  
 ACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAAT  
 AGGAGCTTTGTTCCCTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCG  
 CAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTAATGTCTGGTATA  
 GTGCAGCAGCAGAACAAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCT  
 GTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGG  
 CTGTGAAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGC  
 TCTGGAAAACCTCAATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGAATGCTAGTTGGAG  
 TAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGG  
 ACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAA  
 TCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAAATGAACAAGAATTAATTGGAATTAGATAA  
 ATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAAACATAACAAATTTGGCTGTGGTATA  
 TAAAATTATTATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTAAGAATAGTT  
 TTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTACCATT  
 ATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGACCCGACAGGCCCGAAG  
 GAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGATTA  
 GTGAACGGATCTCGACGGTATCGCCGAATTCACAAATGGCAGTATTCATC  
 CACAATTTTaaaagaaaaggggggATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAG  
AATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAAC  
AAATTACaaaaattcaaaattttCGGGTTATTACAGGGACAGCAGAGAT  
CCACTTTGGGGCGATAAGCTTGGGAGTTCGCGTTACATAAATTACGGTA  
 AATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAAT

**Figura 9A**

AATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTC  
 AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTG  
 TATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCC  
 CGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGC  
 AGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGG  
 CAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAG  
 TCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAAC  
 GGGACTTTCAAAATGTCGTAACTCCGCCCATTTGACGCAAAATGGGC  
 GGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAA  
 CCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAA  
 GACACCGACTCTAGAGgatccccaccggtcgccaccatggtgagcaaggg  
 cgaggagctgttcaccgggtggtgcccacctcctggtcgagctggacggcg  
 acgtaaacggccaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgcc  
 acctacggcaagctgacctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcc  
 cgtgccctggcccaccctcgtgaccaccctgacctacggcgtgcagtgt  
 tcagccgctaccccgaccacatgaagcagcagacttcttcaagtccgcc  
 atgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttcaaggacgacgg  
 caactacaagaccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggtga  
 accgcatcgagctgaagggatcgacttcaaggaggacggcaacatcctg  
 gggcacaagctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggc  
 cgacaagcagaagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccgccacaaca  
 tcgaggacggcagcgtgcagctcgccgaccactaccagcagaacaccccc  
 atcggcgacggccccgctgctgctgcccgacaaccactacctgagcaccca  
 gtccgcccctgagcaaacgccccaacgagaagcgcgatcacatggtcctgc  
 tggagttcgtgaccgcccgggatcactctcgcatggacgagctgtac  
 aagtaaagcggccggactctagctcgagACCTAGAAAAACATGGAGCAAT  
 CACAAGTAGCAATACAGCAGCTACCAATGCTGATTGTGCCTGGCTAGAAG  
 CACAAGAGGAGGAGGAGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTA  
 AGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGA  
 AAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCCTCCAACGAAGACAAGatcgte  
 gagAGATGCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTTGCTTGACTGGGTCTCTCT  
 GGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCA  
 CTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGC  
 CCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGT  
 CAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGT

**Figura 9B**

**Virus Indiana**

MKCLLYLAFLEFIGVNCCKFTTVFPHNQGNWKNVPSNYHYCPSSDDLWNHNDLIGTAIQVKMPKSHKAIQADGWMCHASKWVTT  
 CDFRWYGPKYITQSIRSFPTPSVEQCKESI EQTKQGTWLNPGFPPOSCGYATVTDAAEAVIQVTPHHVLVDEYTGWVDSQFTN  
 GKCSNYICPTVHNSTTWHSDYKVKGLCDSNLSMDITFFSEDEGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMOCYCKHGWVRLPS  
 GVWFEMADKDLFAAARFPECEPSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPVLDLSYLAPKNPGTGPAF  
 TIINGTLKYPETRYIRVDIAAPILSRMVGMI SGTTERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLR TSSGYKPLYMIGHGMLDSDLHLS  
 SKAQVFEHPHIQDAASQLPDESLFPFGDTGLSKNPIELVEGWFPSSWKSSIASFFPIIGLIIGLFLVLRVGIHLCTIKLKHTKKR  
 QIYTDIEMNRLGK

**Virus Chandipura**

MTSSVTISVLLISFITPLYSYLSIAPFENTKLDWKVPTKNTRYCPMGGEWFLEPGLQEESFLSSTPIGATPSKSDGFLCHAA  
 KWVTTCDFRWYGPKYITHSIHNKPTRSDCTALASYKSGTLVSLGFPPESCGYASVTDSEFLVIMITPHHVGVDDYRGHWVD  
 PLFVGGCEDQSYCDTIHNSVWI PADQTKKNICGQSFTPLTVTVAYDKTEIAAGGIVFKSKYHSHMEGARTCRLSYCGRNGI  
 KFPNGEWVSLMLKLRSKRNLYFPCLKMCPTGIRGEIYPSIRWAQVLTSEIQRILDYSLCQNTWDKVERKEPLSPDLDSYLASK  
 SPGKGLAYTVINGTLSFAHTRYVRMWIDGPVLKEPKGKRESPSGISSDIWTQWFKYGDMEIGPNGLLKTAGGYKFPWHLLGMG  
 IVDNELHELSEANPLDHPQLPHAQSIADDESEIFFGDTGVSKNPVELVTGWFTSWKESLAAGSCPDLRCPPLFPPIVYVYLQKA  
 QMEERGERSDSFEMRI FKPNNMRARV

**Virus Pirv**

MDLFPILVVLMTDTVLGKGFQIVFPDQNELEWRPVVGDSTRHCQPSSEMOPDGRSQTILTGPAPVITPSKSDGFI CHAAKW  
 TTCDFRWYGPKYITHSIHNLRPTTSDCETALQRYKDGSLINLGFPPESCGYATVTDSEAMLVQVTPHHVGVDDYRGHWIDPLF  
 PGGECSNFCPTVHNSSVWIPKSQKTDICAQSFKNIKMTASYPSEGALVSDRFAFHSAYHPNMPGSTVCIMDFCEQKGLRFTN  
 GEWMGLNVEQSIREKKISAIFFNCVAGTEIRATLESEGARTLTWETQRM LDYSLCQNTWDKVSRKEPLSPDLDSYLSPRAPGK  
 GMAYTVINGTLHSAHAKYIRTWIDYGEKKEIKGGRGEYSKAPPELLWSQWDFGPFKIGPNGLLHTGKTKFPPLYLIGAGIIDE  
 DLHELDEAAPIDHPQMPDAKSVLPEDESEIFFGDTGVSKNPIELIQGWFSNWRRESVMAIVGIVLLIVVTF LAIKTRVRLNCLWR  
 FRKRIIVRQEVDDVESRLNHFEMRGFPEYVKR

**Virus New Jersey**

MLSYLI PALAVSPILGKIEIVFPQHTTGDWKRVPHEYNICPTADKNHGTQTGIPVELTMPKGLTTHQVEGFMCHSALWMTT  
 CDFRWYGPKYITHSIHNPTDYQCLEAIKSYKDGVSFNPGFPPOSCGYATVTDAAEAIIVTTPHSVKVDEYTGWIDPHFIG  
 GRCKGQICETVHNSTKWFTSSDGEVCSQLFTLVGGIFFSDSEEITSMGLPETGIRSNYPPIYISTEGICKMPFCRKQGYKLN  
 DLWFQIMDPLDKTVRDLPHIKDCDLSSIIITPGEHATDISLISDVERILDYALCQNTWSKIESGEPITPVLDLSYLGPKNPGV  
 GPVFTIINGSLHYFTSKYL RVELESPIVPRMEGKVAGTRIVROLWDQWFPFGEVEIGPNGVLKTKQGYKPLHIIGTGEVDS  
 IKMERVVKHWEHPHIEAAQTFLLKDDTGEVLYYGDGVSKNPVELVEGWFSGWRSSIMGVLA VIIGFVILMFLIKLIGVLSL  
 FRPKRRPIYKSDVEMAHFR

**Virus Cocal**

MNPLLLTFIVLPLCSHAKFSIVFPQSQKGNWKNVPSNYHYCPSSSDQNWNHNDLLGITMKVKMPKTHKAIQADGWMCHAAKWIT  
 TCDFRWYGPKYITHSIHQPTSEQCKESI KQTKQGTWMSPGFPQPCGYATVTDVAVVQVQATPHHVLVDEYTGWIDSQFP  
 NGKCBTEBCTVHNSTVWYSDYKVTGLCDATLVDTETIFFSEDEGKESIGKPNTRYRSNYFAYEKDKVCKMNYCKHAGVRLPS  
 GVWFEFVDQDVYAAAKLPECPVGTI SAPTQTSVDVSLILDVERILDYSLCQETWSKIRSKQPVSPVDLSYLAPKNPGTGPAF  
 TIINGTLKYPETRYIRIDIDNPIISKMVGKISGSQTERELWTEWFPYEGVEIGPNGILKTPGTGYKFLPFMIGHGMLDSDLHKT  
 SQAQVFEHPHLAEAPKQLPEBETLFPFGDTGISKNPVELIEGWFPSSWKSTVVTFFFAIGVFILLYVVARIVIAVRYRQGSNNK  
 RIYNDIEMSRFRK

**Virus Isfahan**

MTSVLFMVGVLGAPGSTHCSIQIVFPSETKLWKPVLKGTTRYCPQSAELNLEPDLKTMAFDSKVPYIGITPSNSDGYLCHAAK  
 WVTTCDFRWYGPKYITHSVHSLRPTVSDCKAAVEAYNAGTLMYPGFPPESCGYASITDSEFYVMLVTPHPVGVDDYRGHWVDP  
 LPPTSECNSNFCETVHNATMWIPKDLKTHDVCSQDFQTI RVSVMYPTKPTKGADLT LKSKPHAHMKGDRVCKMKPCNKGLR  
 LGNGEWIEVGDVMDLNSKLLSLFPDCLVGSVVKSTLLSEGVQ TALWETDRLLDYSLCQNTWEKIDRKEPLSAVDLSYLAPRS  
 PGKGMAYIVANGSLMSAPARYIRVWIDSPILKEIKGKESASGIDTVLWQWLPFNGMELGPNGLIKTKSGYKFPPLYLLGMGI  
 VDQDLQELSSVNPVDHHPVIAQAFVSEGEVFPFGDTGVSKNPIELISGWFSDWKETAALGFAAISVILIIIGLMLRLLPLLR  
 RRKQKVIYKDVLENSFDPQAFHR

**Virus SVCV**

MSIISYIAFLLLDSTFGPIPIFVPSGQNI SWQPVIQPFDYQCPHGNLNTMGLSATKLTIKSPSVFSTDKVSGWICHAAEWK  
 TTCDFRWYGPQYITHSIHPI SPTIDBCKRIISRIASGTDEDLGFPPOSCGWASVTTVSNNTNYKVVPHSVHLEPYGGHWIDHEF  
 NGGECREKVCMEKGNHSIWI TDETVQHECEKHEEVEGIMYGNAPRGDAIYINNPIIDKHHRVYRFGGSCRMKFCNKDGI KFT  
 RGDWVEKTAETLTNIYANIECADGTLSVSGHRPGLDLIDTVFNLENVVEYTLCEGTKRKINNQEKLTSVDLSYLAPRIGGFGS  
 VFRVRNGLTERGSTYIKIEVEGPIVDSLNGTDPRTNASRVFDDWELDGNIIYQGFNGVYKGDGKIHIPLNMIESGIIIDDEL  
 QHAFQADIIPHPHYDDDEIREDDIPFDNTGENGNPVDVAVVEVWSGWTSLKFPGTTLVALILIFLLIRCCVACTYLMKSKRP  
 ATESHMERSFV

**Figura 10**

MSYLIFALAVSPILGKIEIVFPQHTTGDWKRVPHEYNYCPTSADKNSHGTQTGIPVELTMP  
KGLTTHQVEGFMCHSALWMTTCDFRWYGPKYITHSIHNEEPTDYQCLEAIKSYKDGVSFNPG  
FPPQSCGYGTVDAAEAHIVTVTPHSVKVDEYTGEWIDPHFIGGRCKGQICETVHNSTKWFTS  
SDGESVCSQLFTLVGGIFFSDSEEITSMGLPETGIRSNYFPYISTEGICKMPFCRKQGYKLK  
NDLWFQIMDPDLDKTVRDLPHIKCDLSSSIITPGEHATDISLISDVERILDYALCQNTWSK  
IESGEPITPVDLSYLGPKNPGVGPVFTIINGSLHYFTSKYLRVELESPVIPRMEGKVAGTRI  
VRQLWDQWFPFGEVEIGPNGVLKTKQGYKFPLHIIGTGEVDSDIKMERVVKHWEHPHIEAAQ  
TFLKKDDTGEVLYYGDVGSKNPVELVEGWFSGWRSSIASFFFIIGLIIGLFLVLRVGIHLC  
IKLKHTKKRQIYTDIEMNRLGK (SEQ ID NO :8)

**Figura 11**