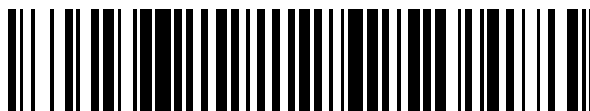


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 274**

51 Int. Cl.:

C12N 15/867 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2010** **E 13194273 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018** **EP 2770061**

54 Título: **Vectores lentivirales no integrantes**

30 Prioridad:

24.07.2009 US 228491 P

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

28.02.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 702 274 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 lentivirales no integrantes

Campo técnico

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

Antecedentes

10 Las células dendríticas (CD) son células presentadoras de antígenos esenciales para la iniciación y el control de las respuestas inmunitarias. Las CD pueden capturar y procesar antígenos, migrar de la periferia a un órgano linfóide y presentar los antígenos para que haya células T en un modo restringido del complejo principal de histocompatibilidad (CPH). Estas células proceden de la médula ósea (MO) y muestran una morfología dendrítica y alta movilidad. El descubrimiento de las CD como células presentadoras de antígeno especializadas (CPA) ha impulsado iniciativas de estrategias de inmunización/vacunación a base de CD que implican cargar las CD in vitro con antígenos específicos (Banchereau y Palucka, A. K. 2005. Nat. Rev. Immunol. 5: 296-306; Figdor, et al. 2004. Nat. Med. 10: 475-480). Todas estas iniciativas, sin embargo, implican la trabajosa preparación de tratamientos específicos para el paciente que incluyen la carga de las CD autólogas ex vivo con antígenos específicos, que se administran después al paciente.

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

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

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

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

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

Algunas realizaciones de la presente invención

55 Aunque las partículas víricas pseudogenotipadas SVGmu podían transducir de manera selectiva células que expresaban el antígeno CD-SIGN, varios aspectos del sistema las hacían inadecuadas para su uso terapéutico. Por ejemplo, la proteína de fusión E3/E2 muestra un epítipo antigénico de hemaglutinina de influenza, el genoma del virus

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

Una alineación de la proteína E3-E2 SVGmu, usada en la patente internacional WO 2008/011636 para pseudogenotipar un vector lentiviral contra tres variantes de la proteína E ejemplares de la presente invención, se muestra en la Figura 1. La numeración indicada en la Figura 1 hace referencia a la cepa HR de las proteínas de envoltura del virus Sindbis. A menos que se indique de otro modo, la numeración usada en la presente memoria hace referencia a esta cepa del virus Sindbis. Los presentes inventores han modificado la proteína SVGmu para proporcionar un mejor sistema de producción lentiviral. Las partículas víricas de la invención se producen en un título significativamente mayor que las que se producen usando SVGmu y también estimulan una respuesta inmunitaria más potente. Además, las partículas lentivirales pseudogenotipadas presentan mejores títulos y una mejor infectividad mientras se mantiene la selectividad para las CD.

En una realización, la invención proporciona una partícula de un vector retroviral, tal como uno lentiviral, que comprende: (a) una envoltura que comprende una glucoproteína E2 del virus Sindbis de la SEQ ID N°: 1 en la que 160X no está o es un aminoácido no ácido, o una variante de la SEQ ID N°: 1 capaz de infectar células dendríticas; en la que dicha glucoproteína E2 o su variante no está fusionada con E3 y (b) un genoma lentiviral que comprende una de interés.

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

Preferiblemente, 160X es uno de los aminoácidos pequeños o alifáticos, incluyendo glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina. En un aspecto, 160X no está o es glicina, valina, leucina o isoleucina. En una realización, X es glicina.

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

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

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

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

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

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

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

En algunos casos, primero se expresa la proteína E2 como una poliproteína en fusión con al menos E3 o en fusión con una secuencia líder. En algunas realizaciones, E2 se expresa como parte de una poliproteína E3-E2-6K-E1. El virus Sindbis expresa de manera natural E2 como parte de una poliproteína y las regiones de unión para E3/E2, E2/6K y 6K/E1 presentan secuencias reconocidas y escindidas por endopeptidasas. La secuencia de poliproteínas E3/E2 se presenta como SEQ ID N°: 20. Normalmente, la unión E3/E2 se escinde por furina o una serina endopeptidasa tipo furina entre los restos 65 y 66 de la poliproteína E3/E2. La furina presenta especificidad para los restos arginina

apareados que están separados por dos aminoácidos. Para mantener la escisión E3/E2 por furina, los restos 62-66 (RSKRS; SEQ ID N°: 26) deberían mantener los dos restos arginina con una separación de dos aminoácidos y el resto serina.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Como se indicó anteriormente, las secuencias E2 de la invención, incluyendo cualquiera de las SEQ ID Nos: 3-15 y

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

Sumario de la invención

La presente invención se presenta en las reivindicaciones adjuntas.

Esta solicitud de patente se refiere a vectores lentivirales pseudogenotipados que comprenden una envoltura que comprende una glucoproteína de un arbovirus, en los que la partícula comprende una integrasa no funcional y un genoma de vector lentiviral que comprende una mutación o eliminación del tracto de polipurina proximal 3'-LTR. La glucoproteína del arbovirus puede provenir del virus Sindbis, virus del Dengue y virus de la encefalitis equina venezolana. En particular, cuando la glucoproteína es una proteína E2 del virus Sindbis, la proteína E2 tiene, al menos, una modificación de aminoácidos en el resto 160 comparado con una SEQ ID N°: 1. La modificación de aminoácidos puede ser una eliminación o un aminoácido distinto del ácido glutámico. La glucoproteína E2 puede ser alternativamente una proteína variante que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia para la SEQ ID N°: 1 y también presenta una modificación del resto 160 que es una eliminación o un aminoácido distinto del ácido glutámico. La glucoproteína facilita la infección de células dendríticas. En todos los casos la glucoproteína E2 no es parte de una proteína de fusión con el virus Sindbis E3. En algunas realizaciones, la glucoproteína E2 o la variante se une a CD-SIGN. El vector lentiviral también comprende un genoma lentiviral que comprende una secuencia de interés.

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

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

La invención también proporciona un sistema de empaquetamiento lentiviral para producir una partícula del vector lentiviral pseudogenotipado no integrante, como se presenta en las reivindicaciones, que comprende una célula empaquetadora que comprende (a) un ácido nucleico que codifica una integrasa no funcional; (b) un genoma del vector lentiviral que comprende una mutación o eliminación del tracto de polipurina (PPT) que hace al PPT no funcional; y (c) un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica una glucoproteína de envoltura de un arbovirus. También se describe en este documento un sistema de empaquetamiento del vector lentiviral para producir una partícula del vector lentiviral pseudogenotipado, que comprende: una primera molécula de ácido nucleico que codifica una glucoproteína E2 del virus Sindbis de la SEQ ID N°: 1 en que el resto 160 está ausente o un aminoácido distinto al ácido glutámico o su variante capaz de infectar células dendríticas con al menos un 80% de identidad con la SEQ ID N°: 1 y en la que el resto 160 no está o es un aminoácido distinto al ácido glutámico, una segunda molécula de ácido nucleico que codifica proteínas gag y pol; una tercera molécula de ácido nucleico que codifica rev y un genoma del vector lentiviral que comprende una secuencia de interés. La glucoproteína E2 o variante del sistema de empaquetamiento presenta una secuencia de aminoácidos como se ha definido en cualquiera de las realizaciones anteriores. La proteína pol tiene una integrasa no funcional. En una realización particular, la integrasa no funcional tiene una mutación D64V. En algunas realizaciones, la segunda molécula de ácido nucleico es un genoma lentiviral no integrante. En realizaciones particulares, el sitio att muta o se suprime. El sitio PPT muta o se suprime haciendo a PPT no funcional. En algunas realizaciones, el sitio att muta o se elimina además del sitio PPT que muta o se elimina (haciéndolo no funcional). El genoma lentiviral no integrante se puede usar en asociación con una integrasa no funcional y en combinación con cualquiera de las proteínas E2 o las variantes. Se prefiere que se produzcan las partículas del vector lentiviral a un título de al menos 10^5 UI/ml. En algunos casos, se transfecta una célula con las moléculas de ácido nucleico primera y cuarta descritas anteriormente. La célula puede comprender previamente las moléculas de ácido nucleico segunda y tercera, en una transformación estable.

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

Se proporciona un método para preparar una partícula de un vector lentiviral de una cualquiera de las variantes o combinaciones anteriores, que comprende expresar en una célula una primera molécula de ácido nucleico que codifica una glucoproteína E2 del virus Sindbis de la SEQ ID N°: 1 en que el resto 160 es distinto del ácido glutámico o su variante, capaz de infectar células dendríticas con al menos un 80% de identidad de secuencia para la SEQ ID N°: 1 y en la que el resto 160 no está o es un aminoácido distinto al ácido glutámico y (ii) una segunda molécula de ácido nucleico en la que se puede transcribir la segunda molécula de ácido nucleico y la transcripción se puede ensamblar en una partícula del vector lentiviral pseudogenotipado.

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

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

Breve descripción de los dibujos

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

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

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

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

La Figura 5A presenta esquemas de genomas lentivirales ilustrativos. La Figura 5B presenta secuencias de la región U3 de tres construcciones vectoriales. (A) Los elementos contenidos en todos los vectores lentivirales se muestran en el genoma del vector ilustrativo en la parte superior. Los promotores utilizados incluyen el promotor de Ubiquitina-C humana (UbiC), el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) o el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV, por sus siglas en inglés). Además de la región SIN U3 estándar, se muestra una serie de eliminaciones extendidas. Las alineaciones de secuencias de las regiones U3 de todos los 3 vectores se muestran en (B). La secuencia mostrada incluye el tracto de polipurina (PPT), que se elimina en la construcción 704 y la eliminación U3 extendida presente en ambas construcciones 703 y 704.

Las Figuras 6A y 6B muestran la expresión GFP del vector lentiviral después de la transducción de células 293T. En la Figura 6A, GFP se unió de manera operativa a un promotor de UbiC y en la Figura 6B, GFP se unió de manera operativa a un promotor de CMV. Se determinaron los niveles de expresión de GFP a partir de vectores lentivirales deficientes en integrasa 48 h después de transducción de células 293T que expresan CD-SIGN. La expresión de GFP

en células transducidas se determinó por métodos de flujo citométricos clásicos; un total de 50.000 procesos se recogió de cada mezcla de células transducidas para determinar los niveles medios de expresión.

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

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

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

Descripción detallada

La presente descripción proporciona métodos y composiciones para reconocer células dendríticas (CD) usando una partícula vectorial lentiviral (por ej., un virión, una partícula lentiviral) para suministrar una secuencia de interés a las CD. La partícula vectorial lentiviral comprende una variante de glucoproteína de envoltura derivada del virus Sindbis E2 y un genoma que comprende la secuencia de interés y, opcionalmente, otros componentes. La variante glucoprotéica presenta una peor unión al sulfato de heparán comparado con HR, una cepa del virus Sindbis de referencia. La glucoproteína de envoltura facilita la infección de las células dendríticas por las partículas vectoriales lentivirales. "Facilita" la infección, como se usa en la presente memoria, es lo mismo que facilita la transducción y se refiere a la función de la glucoproteína de envoltura, que actúa sola o de acuerdo con otras moléculas, en la activación o mejora de la entrada mediada por receptores de una partícula retroviral o lentiviral pseudogenotipada en una célula diana.

En general, las partículas vectoriales lentivirales se producen por una estirpe celular que contiene uno o más vectores plasmídicos y/o elementos integrados que codifican juntos los componentes necesarios para generar partículas vectoriales funcionales. Estas partículas vectoriales lentivirales no son típicamente competentes para la replicación, es decir, son sólo capaces de una sola serie de infección. Lo más frecuentemente, se utilizan múltiples vectores plasmídicos o casetes de expresión individuales integrados de manera estable en el cromosoma celular productor para separar los diversos componentes genéticos que generan las partículas vectoriales lentivirales; sin embargo, se puede usar un solo vector plásmido con todos los componentes lentivirales. En un ejemplo, la estirpe de empaquetamiento se transfecta con uno o más plásmidos que contienen el genoma del vector vírico, incluyendo las LTR, una secuencia de empaquetamiento que actúa en cis y la secuencia o las secuencias de interés, al menos un plásmido que codifica los componentes enzimáticos y estructurales del virus (por ej., gag y pol) y, al menos, un plásmido que codifica una glucoproteína de envoltura de Arbovirus. Las partículas víricas brotan a través de la membrana celular y comprenden un núcleo que incluye típicamente dos genomas de ARN que contienen la secuencia de interés y una glucoproteína de envoltura de Arbovirus que reconoce a las células dendríticas. Cuando la glucoproteína del Arbovirus es una glucoproteína E2 del virus Sindbis, la glucoproteína se modifica genéticamente para que presente una menor unión al sulfato de heparán comparado con la HR de la cepa de referencia. Esto normalmente implica, al menos, un cambio de aminoácidos comparado con la secuencia de glucoproteínas E2 de HR.

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

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

5 A. Envoltura del vector vírico

Los virus transmitidos por los artrópodos (Arbovirus) son virus que son transmitidos a un huésped, tales como seres humanos, caballos o pájaros por un artrópodo portador infectado, tal como un mosquito. Los Arbovirus se dividen además en subfamilias de virus que incluyen Alfavirus y Flavivirus, que tienen un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva y una envoltura que contiene glucoproteína. Por ejemplo, el virus de la fiebre del dengue, el virus de la fiebre amarilla y el virus del Nilo Occidental pertenecen a la familia del Flavivirus y virus Sindbis, el virus del bosque Semiliki y el virus de la Encefalitis Equina Venezolana, son miembros de la familia Alfavirus (Wang et al. J. Virol. 66, 4992 (1992)). La envoltura de virus Sindbis incluye dos glucoproteínas transmembrana (Mukhopadhyay et al. Nature Rev. Microbio. 3, 13 (2005)): E1, se cree que es responsable de la fusión, y E2 se cree que es responsable de la unión celular. Las glucoproteínas de envoltura del virus Sindbis son conocidas por pseudogenotipar otros retrovirus, incluyendo los oncoretrovirus y los lentivirus.

Como se discutió anteriormente, se puede usar una glucoproteína de envoltura de Arbovirus para pseudogenotipar un genoma del vector lentiviral. Un lentivirus "pseudogenotipado" es una partícula lentiviral que tiene una o más glucoproteínas de envoltura que están codificadas por un virus que es distinto del genoma lentiviral. La glucoproteína de envoltura se puede modificar, mutar o lograr como se describe en la presente memoria.

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

Aunque el receptor o los receptores celulares en las células dendríticas para los Alfavirus y el virus Sindbis en particular, no se han identificado definitivamente hasta la fecha, un receptor parece ser el CD-SIGN (Klimstra et al., J Virol 77: 12.022, 2.003). El uso de los términos "adhesión", "unión", "reconocimiento" y similares se usan indistintamente y no se usan para señalar ningún mecanismo de interacción entre las glucoproteínas de la envoltura del virus Sindbis y los componentes celulares. El CD-SIGN (ICAM-3 (Moléculas de Adhesión Intracelular 3) específica de células dendríticas-no integrina fijadora; también conocida como CD209) es un receptor del tipo lectina tipo C capaz de unirse rápidamente y de la endocitosis de materiales (Geijtenbeek, T. B., et al. Annu. Rev. Immunol. 22: 33-54, 2.004). Parece que E2 dirige a los virus a las células dendríticas a través de CD-SIGN. Como se muestra en la presente memoria, las células que expresan CD-SIGN son transducidas por partículas del vector vírico pseudogenotipadas con E2 del virus Sindbis mejor (al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces o al menos 10 veces mejor) que las células isogénicas que no expresan CD-SIGN. El mecanismo de cómo la glucoproteína E2 facilita la infección vírica parece que implica a CD-SIGN, posiblemente a través de unión directa a CD-SIGN o que causa un cambio en la conformación o algún otro mecanismo. Sin tener en cuenta el mecanismo real, el reconocimiento por E2 es preferente para células que expresan CD-SIGN, esto es células dendríticas.

También parece que el virus Sindbis se une a células vía sulfato de heparán (Klimstra et al., J Virol 72: 7357, 1998; Burmes y Griffin, J Virol 72: 7349, 1998). Debido a que el sulfato de heparán y otros glucosaminoglucanos de la superficie celular se encuentran en la superficie de la mayoría de los tipos de células, es deseable reducir la interacción entre el sulfato de heparán y glucoproteínas de envoltura de Sindbis. Esto se puede llevar a cabo por la disminución de la unión de la envoltura del virus de Sindbis al sulfato de heparán o el aumento de la unión, por ej., aumentando la afección de la envoltura del virus Sindbis a las células dendríticas o ambos. Como resultado, la unión no específica a otras moléculas, que se puede expresar por otros tipos de células y que puede tener lugar incluso si la envoltura es específica para CD-SIGN, se reduce, y la especificidad mejorada puede servir para evitar efectos secundarios no deseados, tales como efectos secundarios que pueden reducir la respuesta inmunitaria deseada o los efectos secundarios asociados a la transducción inespecífica de otros tipos de células. Alternativamente, o además, de las ventajas de transducción relativamente específica de células que expresan CD-SIGN, las partículas víricas pseudo-

genotipadas con la glucoproteína E2 de la envoltura del virus Sindbis pueden ofrecer otras ventajas respecto a las partículas víricas pseudo-genotipadas con glucoproteínas, tales como VSVG. Ejemplos de dichas ventajas incluyen la menor lisis mediada por complemento y/o el menor reconocimiento de neuronas, ambas de las cuales se cree que se asocian a la administración de partículas víricas pseudo-genotipadas de VSV-G.

- 5 En diversos ejemplos, las partículas vectoriales lentivirales se unen específicamente a células que expresan CD-SIGN y presentan una menor unión o ninguna al sulfato de heparán. Esto es, se puede modificar una glucoproteína E2 de la envoltura del virus Sindbis para dirigir preferentemente el virus a las células dendríticas que expresen CD-SIGN con respecto a otros tipos de células. Basándose en la información obtenida a partir de estudios estructurales y del modelado molecular, entre otros estudios, se diseñan secuencias de variantes de proteínas de envoltura, especialmente las glucoproteínas E2 y E1, y se generan de manera que las glucoproteínas mantengan sus funciones como proteínas de envoltura, pero teniendo la especificidad de unión, avidéz o nivel de unión deseados. Se pueden crear secuencias de variantes candidatas para cada glucoproteína y analizarlas usando los métodos descritos a continuación, u otros métodos conocidos en la técnica, para identificar las glucoproteínas de la envoltura con las características más deseables.
- 10
- 15 Algunas secuencias de variantes de E2 de Sindbis presentan al menos una modificación de aminoácidos en el resto 160, cuando se compara con la SEQ ID N°: 1. Se elimina o se cambia el resto 160 con un aminoácido distinto del ácido glutámico. Una modificación es, lo más comúnmente, una sustitución de al menos un aminoácido, pero, alternativamente, puede ser una adición o eliminación de uno o más aminoácidos. Preferiblemente, cualesquiera otros aminoácidos son pocos en número y no comprenden un epítipo antigénico (por ej., la secuencia del marcador de hemaglutinina), que puede comprometer la seguridad. Cuando hay dos o más modificaciones, ambas pueden ser del mismo tipo (por ej., una sustitución) o diferentes (por ej., una sustitución y una eliminación). Se pueden dispersar o situar de manera contigua múltiples modificaciones en la secuencia proteínica.
- 20

- 25 En el primer caso, las secuencias de variantes comprenden al menos una modificación de aminoácidos en la región de aproximadamente el resto 50 a aproximadamente el resto 180. Dentro de esta región son los aminoácidos los que están implicados en la unión al sulfato de heparán. Reduciendo la carga positiva neta de E2, se puede reducir la interacción electrostática con el sulfato de heparán, dando como resultado una menor unión al sulfato de heparán. Los aminoácidos cargados positivamente candidatos en esta región incluyen lisinas en los restos 63, 70, 76, 84, 97, 104, 129, 131, 133, 139, 148, 149, 159 y arginina en los restos 65, 92, 128, 137, 157, 170, 172 (Bear et al., *Virology* 347: 183-190, 2006). Al menos, varios de estos aminoácidos están implicados directamente en la unión de E2 al sulfato de heparán. La carga positiva neta se puede reducir por la eliminación de lisina o arginina o la sustitución de lisina o arginina con un aminoácido neutro o cargado de manera negativa. Por ejemplo, una o más de estas lisinas y argininas se pueden reemplazar con el ácido glutámico o aspártico. Algunas realizaciones presentan al menos una sustitución de lisina 70, 76 ó 159. En los casos en que E2 se expresa como una poliproteína con E3, se mantiene la lisina situada adyacente al sitio de unión E3/E2 natural – esto es, la secuencia de reconocimiento y el sitio de escisión no se modifican. Alternativamente, la secuencia del sitio de escisión de endopeptidasa natural se reemplaza con una secuencia de reconocimiento para una endopeptidasa diferente.
- 30
- 35

- 40 Algunas de las variantes de E2 también se pueden modificar de una manera que influya de manera positiva en la unión a las células dendríticas. La modificación del ácido glutámico encontrado en el resto 160 en la secuencia HR de referencia puede mejorar la unión a las células dendríticas (véase Gardner et al., *J Virol* 74, 11849, 2000, que se incorpora en su totalidad). Las modificaciones, tales como una eliminación del resto 160 o la sustitución del resto 160, se encuentran en algunas variantes. En las variantes particulares, un aminoácido no cargado es sustituido por Glu, en otras variantes, un aminoácido no ácido es sustituido por Glu. Típicamente, Glu160 se reemplaza con uno de los aminoácidos pequeños o alifáticos, incluyendo glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina.

- 45 Otras variantes comprenden dos o más modificaciones de aminoácidos. Típicamente, en estas variantes, una de las modificaciones es Glu160 y la modificación o las modificaciones restantes son cambios de una o más de las lisinas y argininas en el resto de aproximadamente 50 a aproximadamente 180 de expansión de la región. Algunas de las variantes comprenden una modificación de Glu160 en un resto no ácido o la eliminación y una o más modificaciones de lisina 70, lisina 76 o lisina 159 con un aminoácido no básico. Algunas variantes específicas comprenden una Glu160 a Gly, Lys 70 a Glu y Lys 159 a Glu; una Glu 160 a Gly, Lys 70, 76 y 159 a Glu; una eliminación de Glu 160 y Lys 70 y 159 a Glu y una eliminación de Glu 160 y Lys 70, 76 y 159 a Glu.
- 50

- 55 En algunos casos, la proteína E2 primero se expresa como una poliproteína en fusión con al menos E3 o en fusión con una secuencia líder. Sin tener en cuenta si la secuencia líder es E3 u otra secuencia, E2 en la envoltura vírica debería estar exenta de la E3 u otra secuencia líder. En otras palabras, E2 no es preferiblemente una proteína de fusión E3/E2 (por ej., la proteína de fusión E3/E2 denominada SVGmu). En algunas realizaciones, E2 se expresa como parte de la poliproteína E3-E2-6K-E1. El virus Sindbis expresa de manera natural E2 como parte de una poliproteína y las regiones de unión para E3/E2, E2/6K y 6K/E1 presentan secuencias reconocidas y escindidas por endopeptidasas. Normalmente, la unión E3/E2 es escindida por furina o una serina endopeptidasa tipo furina entre los restos 65 y 66. La furina presenta especificidad por los restos de arginina apareados que están separados por dos aminoácidos. Para mantener la escisión E3/E2 por furina, los restos 62-66 (RSKRS; SEQ ID N°: 26) deberían mantener los dos restos arginina con una separación de dos aminoácidos y el resto serina. Alternativamente, se puede usar una secuencia de escisión diferente en vez de la secuencia de escisión de furina E3/E2 o cualquiera de las otras
- 60

secuencias de escisión. Los sitios de reconocimiento y escisión pueden ser incorporados por endopeptidasas, incluyendo, sin limitación, endopeptidasas aspárticas (por ej., catepsina D, quimosina, proteasa VIH), cisteína endopeptidasas (bromelaínas, papaína, calpaína), metaloendopeptidasas, (por ej., colagenasa, termolisina), serina endopeptidasas (por ej., quimotripsina, factor IXa, factor X, trombina, tripsina), estreptocinasas. Las secuencias del sitio de reconocimiento y escisión para estas enzimas son conocidas.

También se pueden modificar aminoácidos en E2, distintos de los ya mencionados. En general, una secuencia de la variante E2 tendrá al menos un 80% de la identidad de secuencias de aminoácidos para la secuencia de referencia E2 o puede tener al menos un 82%, al menos 85%, al menos 87%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 95% o al menos 98% de identidad de secuencia. La glucoproteína de la variante debería presentar cierta función biológica, tal como la capacidad para facilitar la infección de las células dendríticas por una partícula vírica con una envoltura que comprenda E2. Los experimentos han identificado regiones de glucoproteínas de envoltura que parecen tener una función importante en diversos aspectos del conjunto vírico, la adhesión a la superficie celular y la infección. Cuando se preparan las variantes, se puede usar la siguiente información como directrices. La cola citoplasmática de E2 - aproximadamente los restos 408 a 415 - es importante para el conjunto vírico (West et al. J Virol 80: 4458-4468, 2006; incorporada en su totalidad). Otras regiones están implicadas en la formación de la estructura secundaria (aproximadamente los restos 33-53) y están implicadas en el transporte y la estabilidad de la proteína (aproximadamente los restos 86-119) (Navaratmarajah et al., J Virol 363: 124-147, 2007; incorporada en su totalidad). La variante puede retener carácter hidrófobo de una región que expande la membrana, aproximadamente los restos 370-380. La variante puede retener uno o ambos restos de los sitios de glucosilación ligados a N NIT (restos 196-198) y NFT (restos 318-320) y puede retener uno o más de los sitios que están palmitoilados (C-396, C416 y C417) (Strauss y Strauss, Microbiol Rev 58, 491-562, 1994; págs. 499-509). Por otra parte, muchas regiones de E2 se pueden modificar sin que ocurra ningún proceso perjudicial. Por ejemplo, las inserciones de transposones en muchas diferentes posiciones en E2 aún dan como resultado un virus viable (Navaratmarajah, ibidem).

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

Los marcadores adecuados incluyen, sin limitación, FLAG (DYKDDDDK) (Patente de EE.UU. N° 4.703.004, incorporada en su totalidad), para el cual hay anticuerpos comercialmente disponibles, la proteína de unión a quitina, la proteína de unión a maltosa, glutatión-S-transferasa, poli(His) (Patente de EE.UU. N° 4.569.794, incorporada en su totalidad), tiorredoxina, marcador de HA (hemaglutinina), entre otros. Poli(His) puede ser adsorbido en un medio de afinidad que contenga iones metálicos ligados, por ej., níquel o cobalto y que se eluya con un medio a pH bajo.

Se pueden evaluar las partículas víricas para determinar la especificidad de la glucoproteína de envoltura incorporada al virus que reconoce las células dendríticas. Por ejemplo, se puede obtener una población mixta de células de médula ósea de un individuo y cultivarlas in vitro. Alternativamente, se pueden obtener y usar estirpes celulares isogénicas que expresen o no CD-SIGN. El virus recombinante se puede administrar a la población mixta de células de médula ósea o estirpes celulares isogénicas y se puede ensayar la expresión de un gen indicador incorporado al virus en las células cultivadas. Algunas realizaciones pueden emplear un análisis de dilución limitante, en el que la población mixta de las células se divide en partes separadas, que se incuban después por separado con cantidades decrecientes de virus (por ej., 2 veces, 5 veces, 10 veces menos de virus en cada parte). En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 50%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 60%, 70%, 80% o 90%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% de las células infectadas en la población de células mixtas son células dendríticas que expresan CD-SIGN. En algunas realizaciones, la proporción de células dendríticas infectadas a células no dendríticas infectadas (o células que no expresan CD-SIGN) es al menos aproximadamente 2:1, al menos aproximadamente 3:1, al menos aproximadamente 4:1, al menos aproximadamente 5:1, al menos aproximadamente 6:1, al menos aproximadamente 7:1, al menos aproximadamente 8:1, al menos aproximadamente 9:1, al menos aproximadamente 10:1, al menos aproximadamente 20:1, al menos aproximadamente 30:1, al menos aproximadamente 40:1, al menos aproximadamente 50:1, al menos aproximadamente 100:1, al menos aproximadamente 200:1, al menos aproximadamente 500:1, al menos aproximadamente 1.000:1, al menos aproximadamente 5.000:1, al menos aproximadamente 10.000:1 o más. Para una dilución limitante, se observa una mayor selectividad, típicamente, a mayores diluciones (es decir, cantidades inferiores) del virus de entrada.

La actividad de las partículas víricas pseudogenotipadas se puede determinar por cualquiera de una variedad de técnicas. Por ejemplo, un método preferido para medir la eficacia de la infectividad (UI, unidades infecciosas) es mediante la administración de partículas víricas a células y la medición de la expresión de un producto codificado en

el genoma del vector. Se puede usar cualquier producto que se pueda ensayar. Un tipo de producto conveniente es una proteína fluorescente, tal como una proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés). La GFP y el ensayo se ilustran en los Ejemplos, tal como en el Ejemplo 3. Otros productos que se pueden usar incluyen las proteínas expresadas en una superficie celular (por ej., la detección por la unión de anticuerpos), enzimas y similares. Si el producto es un antígeno y las células son células dendríticas, se puede evaluar la infectividad/actividad por la determinación de una respuesta inmunitaria. Además, es posible determinar los efectos secundarios en un mamífero. La capacidad para reconocer específicamente a las células dendríticas también se puede ensayar directamente, por ejemplo, en un cultivo celular, como se describe a continuación.

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

La entrada de una partícula vectorial lentiviral en una célula diana es otro tipo de evaluación de actividad. Se ha utilizado la proteína de fusión BlaM-Vpr (beta-lactamasa Vpr) para evaluar la penetración vírica VIH-1; se puede usar una fusión de BlaM y una glucoproteína de envoltura de virus Sindbis, tal como E1 o una proteína de fusión E2/E1 para evaluar la eficacia de una proteína de envoltura en facilitar la fusión y la penetración en una célula diana. Se pueden preparar partículas víricas, por ejemplo, por transfección transitoria de células de empaquetamiento con uno o más vectores que comprenden los elementos víricos, BlaM-Vpr, y la envoltura de la variante de interés (y una molécula de afinidad, si es apropiado). Los virus resultantes se pueden usar para infectar células que expresan una molécula, molécula que de reconocimiento (o molécula de afinidad) que se une específicamente en ausencia o presencia del inhibidor libre de unión (tal como un anticuerpo). Después, se pueden lavar las células con medio independiente de CO₂ y cargarse con colorante CCF2 (Aurora Bioscience). Después de una incubación a temperatura ambiente para permitir la terminación de la reacción de escisión, se pueden fijar las células mediante paraformaldehído y analizarse por citometría de flujo y microscopía. La presencia de células azules indica la penetración del virus en el citoplasma; se esperarían menos células azules al añadir el anticuerpo de bloqueo (Cavrois et al. Nat Biotechnol 20: 1151-1154, 2002).

Para investigar si la penetración depende de un pH bajo y para identificar glucoproteínas de envoltura con la dependencia del pH deseada, se puede añadir NH₄Cl u otro compuesto que modifique el pH a la etapa de infección (NH₄Cl neutralizará los compartimentos ácidos de los endosomas). En el caso de NH₄Cl, la desaparición de células azules indicará que la penetración del virus depende de que haya un pH bajo. Además, para confirmar que la actividad depende del pH, se pueden añadir agentes lisosomotrópicos, tales como cloruro de amonio, cloroquina, concanamicina Al, bafilomicina Al, monensina, nigericina, etc., al tampón de incubación. Estos agentes elevan el pH dentro de los compartimentos endosómicos (por ej., Droese y Altendorf, J. Exp. Biol. 200, 1-8, 1997). El efecto inhibitorio de estos agentes revelará la función que tiene el pH en la fusión y la entrada vírica. Se pueden comparar las diferentes cinéticas de entrada entre los virus que muestran diferentes moléculas fusogénicas y las más adecuadas se seleccionan para una aplicación particular.

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

B. Genoma del vector lentiviral

La partícula del vector vírico comprende un genoma, que comprende la secuencia o las secuencias de interés. Se pueden incluir otras secuencias, tales como las secuencias que permiten que el genoma se empaquete en la partícula vírica y las secuencias que activan la expresión de la secuencia o las secuencias de interés después de la transducción

de la célula diana. El genoma puede ser derivado de cualquiera de un gran número de vectores a base del genomas lentiviral disponible y adecuado, incluyendo los identificados para aplicaciones de tratamiento de genes humanos, tales como los descritos por Pfeifer y Verma (Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2: 177-211, 2001). Por simplicidad, el genoma también se denomina "genoma del vector vírico" o "genoma del vector".

1. Cadena principal

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

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

El genoma del vector puede comprender una LTR 3' inactivada o auto-inactivada (Zufferey et al. J Virol 72: 9873, 1998; Miyoshi et al., J Virol 72: 8150, 1998; ambas de las cuales incorporadas en su totalidad). Un vector auto-inactivante presenta, en general, una eliminación de las secuencias del potenciador y promotor de la repetición terminal larga 3' (LTR, por sus siglas en inglés), que se copia en la LTR 5' durante la integración del vector. En un caso, el elemento U3 de la LTR 3' contiene una eliminación de su secuencia potenciadora, la caja TATA, los sitios Sp1 y NF-kappa B. Como resultado de la LTR 3' auto-inactivante, el provirus que se genera después de la entrada y transcripción inversa comprenderá una LTR 5' inactivante. La razón es para mejorar la seguridad por reducción del riesgo de movilización del genoma del vector y la influencia de la LTR en promotores celulares próximos. La LTR 3' auto-inactivante se puede construir por cualquier método conocido en la técnica.

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

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

Como se indicó anteriormente, una propuesta es preparar y usar una integrasa no funcional. La integrasa está implicada en la escisión del ADN romo bicatenario vírico y unión de los extremos a 5'-fosfatos en las dos cadenas de un sitio diana cromosómico. La integrasa presenta tres dominios funcionales: dominio N-terminal, que contiene una unidad que se une a cinc (HHCC), el núcleo del dominio central, que contiene el núcleo catalítico y una unidad DD35E conservada (D64, D116, E152 en VIH-1) y un dominio C-terminal, que tiene propiedades de unión de ADN. Las mutaciones de punto introducidas en la integrasa son suficientes para romper la función normal. Se han construido y caracterizado muchas mutaciones de la integrasa (véase, Philpott y Thrasher, Human Gene Therapy 18: 483, 2007; Apollonia, Thesis submitted to University College London, Abril 2009, págs. 82-97; Engelman et al. J Virol 69: 2729, 1995; Nightingale et al. Mol Therapy, 13: 1121, 2006; todas las cuales se incorporan en su totalidad). La secuencia que codifica la proteína integrasa puede ser eliminada o mutada para hacer la proteína inactiva, preferiblemente sin debilitar de manera significativa la actividad de la transcriptasa inversa o el reconocimiento nuclear, evitándose de ese modo sólo la integración del provirus en el genoma de la célula diana. Las mutaciones aceptables pueden reducir la catálisis de la integrasa, transferencia de cadenas, unión a sitios *att*, unión a un ADN cromosómico huésped y otras funciones. Por ejemplo, una sola sustitución del ácido aspártico a asparagina en el resto 35 de integrasa de VIH o SIV

suprime completamente la integración del ADN vírico. Las eliminaciones de la integrasa estarán confinadas en general al dominio C-terminal. La eliminación de la secuencia codificadora para los restos 235-288 da como resultado una integrasa no funcional útil (Engelman et al. J Virol 69: 2729, 1995). Como ejemplos adicionales, se pueden generar mutaciones, por ejemplo, Asp64 (se proporcionan los números de los restos para VIH-1, se pueden determinar fácilmente los números de los restos correspondientes para la integrasa de otros lentivirus o retrovirus por un experto) (por ej., lentiviral pseudogenotipado, D64V), Asp116 (por ej., D116N), Asn120 (por ej., N120K), Glu152, Gln148 (por ej., Q148A), Lys156, Lys159, Trp235 (por ej., W235E), Lys264 (por ej., K264R), Lys266 (por ej., K266R), Lys273 (por ej., K273R). Se pueden construir otras mutaciones y analizarlas para determinar la integración, expresión de los transgenes y cualquier otro parámetro deseable. Los ensayos para estas funciones son conocidos. Se pueden generar mutaciones por cualquiera de una variedad de técnicas, incluyendo la mutagénesis dirigida y síntesis química de la secuencia de ácidos nucleicos. Se puede realizar una mutación o pueden estar presentes más de una de estas mutaciones en la integrasa. Por ejemplo, una integrasa puede presentar mutaciones en dos aminoácidos, tres aminoácidos, cuatro aminoácidos, etc.

Alternativamente, o en combinación con el uso del mutante o los mutantes de la integrasa, los sitios de adhesión (*att*) en U3 y U5 también pueden ser mutados. La integrasa se une a estos sitios y el dinucleótido 3'-terminal se escinde en los dos extremos del genoma del vector. Un dinucleótido CA está situado en el extremo 3' retraído; el CA es requerido para el proceso; la mutación de los nucleótidos bloquea la integración en el cromosoma huésped. La A del dinucleótido CA es el nucleótido más crítico para la integración y las mutaciones en los dos extremos del genoma proporcionarán los mejores resultados (Brown et al., J Virol 73: 9011 (1999). En una ejemplificación, el CA en cada extremo se cambia a TG. En otras ejemplificaciones, el CA en cada extremo se cambia a TG en un extremo y GT en el otro extremo. En otros ejemplos, el CA en cada extremo se elimina; en otros ejemplos, la A del CA se elimina en cada extremo.

La integración también se puede inhibir por mutación o eliminación del tramo de polipurina (PPT, por sus siglas en inglés) (patente internacional WO 2009/076524), situado de manera proximal a la LTR 3'. El PPT es una secuencia de polipurina de aproximadamente 15 nucleótidos que puede servir como un sitio de unión de cebador para la síntesis del ADN de cadena positiva. En este caso, las mutaciones o eliminaciones de PPT fijan como objetivo el proceso de transcripción inversa. Sin desear estar sujeto a ningún mecanismo, por mutación o eliminación de PPT, la producción del ADN lineal se reduce radicalmente y esencialmente sólo se producen ciclos de ADN de LTR-1. La integración requiere un genoma del vector de ADN bicatenario lineal y la integración se elimina esencialmente sin él. Como se indicó anteriormente, un PPT se puede hacer no funcional por mutación o por eliminación. Típicamente, se elimina el PPT completo de aproximadamente 15 nt, aunque en algunas realizaciones, se pueden realizar eliminaciones más cortas de 14 nt, 13 nt, 12 nt, 11 nt, 10 nt, 9 nt, 8 nt, 7 nt, 6 nt, 5 nt, 4 nt, 3 nt y 2 nt. Cuando se realizan mutaciones, típicamente se realizan múltiples mutaciones, especialmente en la mitad 5' del PPT (McWilliams et al., J Virol 77: 11150, 2003), aunque las mutaciones sencillas y dobles en las primeras cuatro bases aún reducen la transcripción. Las mutaciones realizadas en el extremo 3' de PPT tienen en general un efecto más drástico (Popozo y Levin J Virol 70: 5288, 1996).

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

2. Elementos reguladores

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

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

La elección de un promotor/potenciador interno se basa en el patrón de expresión deseado de la secuencia de interés y las propiedades específicas de promotores/potenciadores conocidos. Así, el promotor interno puede ser activo de manera constitutiva. Ejemplos no limitantes de promotores constitutivos que se pueden usar incluyen el promotor para ubiquitina (patente de EE.UU. 5510474; patente internacional WO 98/32869), CMV (Thomsen et al., PNAS 81: 659, 1984; patente de EE.UU. 5168062), beta-actina (Gunning et al. 1.989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4831-4835) y pgk (véase, por ejemplo, Adra et al. 1987 Gene 60: 65-74; Singer-Sam et al. 1984 Gene 32: 409-417 y Dobson et al. 1982 Nucleic Acids Res. 10: 2635-2637).

Alternativamente, el promotor puede ser un promotor específico del tejido. En algunas realizaciones preferidas, el promotor es un promotor específico de células diana. Por ejemplo, el promotor puede ser de cualquier producto expresado por células dendríticas, incluyendo CD11c, CD103, las TLR, CD-SIGN, BDCA-3, DEC-205, DCIR2, receptor de manosa, Dectin-1, Clec9A, CPH clase II. Además, los promotores se pueden seleccionar para que permitan la expresión inducible de la secuencia de interés. Se conoce una serie de sistemas para expresión inducible en la técnica, incluyendo el sistema sensible a la tetraciclina, el sistema represor del operador lac, así como los promotores sensibles a una variedad de cambios medioambientales o fisiológicos, incluyendo choque térmico, iones metálicos, tales como un promotor de metalotioneína, interferones, hipoxia, esteroides, tales como un promotor de receptores de progesterona o glucocorticoides, radiación, tal como un promotor de VEGF. También se puede usar una combinación de promotores para obtener la expresión deseada del gen de interés. El experto en la materia podrá seleccionar un promotor basándose en el patrón de expresión deseado del gen en el organismo o la célula diana de interés. El genoma vírico puede comprender al menos un promotor sensible a la ARN Polimerasa II o III. Este promotor puede estar unido de manera operativa a la secuencia de interés y también puede estar unido a una secuencia de terminación. Además, se puede incorporar más de un promotor de la ARN Polimerasa II o III. Los promotores de la ARN Polimerasa II o III son conocidos por los expertos en la materia. Se puede encontrar un intervalo adecuado de promotores de la ARN polimerasa III, por ejemplo, en Paule and White, Nucleic Acids Research, Vol. 28, págs. 1283-1298 (2000). Los promotores de la ARN polimerasa II o III también incluyen cualquier fragmento de ADN sintético o modificado que pueda dirigir la ARN polimerasa II o III para transcribir las secuencias codificadoras de ARN cadena abajo. Además, el promotor o los promotores de la ARN polimerasa II o III (Pol II o III) usados como parte del genoma del vector vírico pueden ser inducibles. Cualquier promotor de Pol II o III inducible adecuado se puede usar con los métodos de la invención. Los promotores de Pol II o III particularmente adecuados incluyen los promotores sensibles a tetraciclina proporcionados en Ohkawa y Taira, Human Gene Therapy, Vol. 11, págs. 577-585 (2000) y en Meissner et al. Nucleic Acids Research, Vol. 29, págs. 1672-1682 (2001).

También puede estar presente un potenciador interno en la construcción vírica para aumentar la expresión del gen de interés. Por ejemplo, se puede usar el potenciador de CMV (Boshart et al. Cell, 41: 521, 1985). Se han identificado y caracterizado muchos potenciadores en los genomas víricos, tales como VIH, CMV y en genomas de mamíferos (véase GenBank). Un potenciador se puede usar en asociación con un promotor heterólogo. Cualquier experto en la materia podrá seleccionar el potenciador apropiado basándose en el patrón de expresión deseado.

Un genoma del vector vírico contendrá normalmente un promotor que sea reconocido por la célula diana y que esté unido de manera operativa a la secuencia de interés, componentes víricos y otras secuencias, como se discute en la presente memoria. Un promotor es un elemento de control de la expresión formado por una secuencia de ácidos nucleicos que permita la unión de la ARN polimerasa y que dé lugar a la transcripción. Los promotores pueden ser inducibles, constitutivos, activos de manera temporal o específicos del tejido. La actividad de los promotores inducibles se induce por la presencia o ausencia de factores bióticos o abióticos. Los promotores inducibles pueden ser una herramienta útil en ingeniería genética debido a que la expresión de los genes a los que están unidos de manera operativa se puede activar o desactivar en ciertas fases del desarrollo de un organismo, su fabricación o en un tejido particular. Los promotores inducibles se pueden agrupar como promotores regulados de manera química y promotores regulados de manera física. Los promotores regulados de manera química típicos incluyen, pero no se limitan a, promotores regulados por alcohol (por ej., el promotor del gen de alcohol deshidrogenasa I (alcA)), promotores regulados por la tetraciclina (por ej., el promotor sensible a la tetraciclina), promotores regulados por los esteroides (por ej., el promotor a base del receptor de glucocorticoides de rata (GR, por sus siglas en inglés), promotores a base del receptor de estrógenos humanos (ER, por sus siglas en inglés), promotores a base del receptor de ecdisona de polilla y los promotores basados en la superfamilia de receptores de esteroides/retinoides/tiroides), promotores regulados por metales (por ej., promotores a base del gen de metalotioneína) y promotores relacionados con la patogénesis (por ej., promotores a base de proteínas relacionados con patógenos (PR, por sus siglas en inglés) de *Arabidopsis* y del maíz). Los promotores regulados de manera física típicos incluyen, pero no se limitan a, los promotores regulados por la temperatura (por ej., promotores de choque térmico) y promotores regulados por la luz (por ej., el promotor de SSU de la soja). Otros promotores ilustrativos han sido descritos en otras publicaciones, por ejemplo, en "Promoters used to regulate gene expression" en el sitio web Patent Lens, consultada el 18 de mayo de 2009.

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

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

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

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

El genoma vírico del vector también puede contener elementos genéticos adicionales. Los tipos de elementos que se pueden incluir en la construcción no están limitados de ninguna manera y se pueden elegir para conseguir un resultado particular. Por ejemplo, se puede incluir una señal que facilite la entrada nuclear del genoma vírico en la célula diana. Un ejemplo de dicha señal es la señal del saliente del VIH-1. Además, se pueden incluir elementos que faciliten la caracterización del sitio de integración del provirus en la célula diana. Por ejemplo, se puede incluir una secuencia supresora de silenciamiento de ARN en la construcción. También se puede incluir una secuencia aisladora de, por ej., β -globina de pollo en la construcción del genoma vírico. Este elemento reduce la posibilidad de silenciar un provirus integrado en la célula diana debido a efectos de metilación y heterocromatinización. Además, el aislante puede proteger el gen del potenciador interno, promotor y exógeno de los efectos de posición positivos o negativos del ADN circundante al sitio de integración en el cromosoma. Además, el genoma del vector puede contener uno o más elementos genéticos diseñados para activar la expresión del gen de interés. Por ejemplo, se puede reemplazar un elemento sensible al virus de la hepatitis de la marmota (WRE, por sus siglas en inglés) en la construcción (Zufferey et al. 1999. J. Virol. 74: 3668-3681; Deglon et al. 2000. Hum. Gene Ther. 11: 179-190).

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

Los plásmidos que contienen uno o más de los componentes descritos en la presente memoria son fácilmente contruidos usando las técnicas clásicas conocidas en la técnica. Para los análisis que confirman las secuencias correctas en los plásmidos contruidos, se puede replicar el plásmido en *E. coli*, purificado y analizado por la digestión de una endonucleasa de restricción o se puede determinar su secuencia de ADN por métodos convencionales.

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

Usando las explicaciones proporcionadas en la presente memoria, cualquier experto en la materia reconocerá que la eficacia de un sistema de expresión particular se puede ensayar por la transfección de células de empacquetamiento con un vector que comprende un gen que codifica una proteína indicadora y midiendo la expresión usando una técnica adecuada, por ejemplo, midiendo la fluorescencia de un conjugado proteico fluorescente verde. Se conocen genes indicadores adecuados en la técnica.

3. Tipos de secuencias de interés.

La secuencia de interés no está limitada de ninguna manera e incluye cualquier ácido nucleico que cualquier experto desee integrar, transcribir y expresar en la célula diana. El producto puede ser una proteína o un ácido nucleico. La secuencia de interés puede codificar una proteína o una molécula de ácido nucleico, incluyendo ARNs, ARNm, un ARN bicatenario auto-complementario en el que la región complementaria es mayor que aproximadamente 20

ribonucleótidos de longitud o un ARN que es complementario a un ARN mensajero, donde la unión de dicho ARN complementario (anti-sentido) al ARN mensajero bloquea su capacidad para que se traduzca en la proteína. En algunos casos, la secuencia de interés puede codificar un antígeno contra el que se desea una respuesta inmunitaria. En particular, son deseables antígenos tumorales y antígenos de enfermedades infecciosas de agentes tales como VIH, SHV, VCH, VPH, malaria o tuberculosis.

En algunos casos, la secuencia de interés puede ser un gen que codifique un ARN inhibidor pequeño (ARNsi) o un ARNmico (ARNmi) de interés que consiga aminorar la expresión de una molécula. Por ejemplo, el gen que codifican un ARNsi o un ARNmico se puede usar para conseguir aminorar la expresión de reguladores negativos en una célula, incluyendo los que inhiben la activación o maduración de células dendríticas. Los ARNsi y los ARNmico son conocidos en la técnica (Fire et al., *Nature* 391: 806, 1998; véase también "The RNA Interference Resource" de Applied Biosystems, Trang et al. *Oncogene Suppl* 2: S52, 2008; Taganov, K., et al. 2007. *Immunity* 26: 133-137; Dahlberg, J. E. y E. Lund. 2007. *Sci. STKE* 387: pe25; Tiemann and Rossi, *EMBO Mol Med* 1: 142, 2009). Alternativamente, la secuencia de interés puede codificar un ARN bicatenario auto-complementario en el que la región complementaria tiene más que aproximadamente 20 ribonucleótidos de longitud o un ARN anti-sentido que tiene más que aproximadamente 20 ribonucleótidos de longitud. Los expertos en la materia apreciarán que las moléculas ARNsi, ARNmico, ARNds y ARN anti-sentido se pueden expresar a partir de un promotor de la ARN polimerasa III o, alternativamente, puede ser un componente de un ARN no codificador que se transcriba a partir de un promotor de la ARN polimerasa II.

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

En algunas configuraciones, los vectores contienen secuencias de polinucleótidos que codifican factores de maduración/estimuladores de células dendríticas. Las moléculas estimuladoras ilustrativas incluyen GM-CSF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-15, IL-21, IL-23, TNF α , B7.1, B7.2, 4-1BB, el ligando CD40 (CD40L), el CD40 inducible por fármacos (iCD40) y similares. Estos polinucleótidos están típicamente bajo el control de uno o más elementos reguladores que dirijan la expresión de las secuencias codificadoras en células dendríticas. La maduración de células dendríticas contribuye a una vacunación de éxito (Banchereau, J y Palucka, A. K. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 296-306 (2005); Schuler, G. et al. *Curr. Opin. Immunol.* 15: 138-147 (2003); Figdor, C. G. et al. *Nat. Med.* 10: 475-480 (2004)). La maduración puede transformar las CD a partir de las células implicadas de manera activa en la captura de antígenos en células especializadas para el cebado de células T. Por ejemplo, el acoplamiento de CD40 por CD40L sobre células T cooperadoras con CD4 es una señal crítica para la maduración de CD, dando como resultado una potente activación de las células T CD8. Dichas moléculas estimuladoras se denominan también factores de maduración o factores estimuladores de la maduración. Los puntos de control inmunitarios representan barreras significativas a la activación de la inmunidad celular funcional en el cáncer y anticuerpos antagonistas específicos para ligandos inhibidores en células T incluyendo CTLA4 y muerte programada-1 (PD-1) son ejemplos de agentes diana que se están evaluando en las clínicas. Un mecanismo de tolerancia significativo en las infecciones crónicas y el cáncer es el agotamiento funcional de las células T específicas de Ag que expresan altos niveles de PD-1. Como se ha demostrado que la potencia de inmunización terapéutica está significativamente mejorada por la combinación con el control de los puntos de control inmunitarios, como un ejemplo no limitante, se los expertos en la materia pueden apreciar que una propuesta alternativa para inhibir el punto de control inmunitario es inhibir la expresión de los ligandos de muerte (PD) programada uno y dos (PD-L1/L2). Una manera de conseguir la inhibición es por la expresión de moléculas de ARN, tales como las descritas en la presente memoria, que reprimen la expresión de PD-L1/L2 en las CD transducidas con el vector lentiviral que codifica una o más de las moléculas de ARN. La maduración de las CD o la expresión de elementos particulares tales como puntos de control inmunitarios, por ejemplo ligandos PD-1, se puede caracterizar por análisis de citometría de flujo de la regulación ascendente del marcador superficial, tal como CPH II y el perfil de quimiocinas y citocinas expresadas.

Se puede incluir una secuencia que codifica un producto detectable, normalmente una proteína, para permitir la identificación de células que expresan el producto deseado. Por ejemplo, se incorpora una proteína marcadora fluorescente, tal como proteína fluorescente verde (GFP), en la construcción junto con una secuencia de interés (por ej., que codifique un antígeno). En otros casos, la proteína puede ser detectable por un anticuerpo o la proteína puede ser una enzima que actúe sobre un sustrato para proporcionar un producto detectable o un producto que permita la

selección de una célula diana transfectada o transducida, por ejemplo que confiera resistencia frente a fármacos, tal como una resistencia frente a la higromicina. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia frente a antibióticos u otras toxinas adecuadas para su uso en células eucariotas, por ej., neomicina, metotrexato, blasticidina, entre otros conocidos en la técnica o deficiencias auxotrópicas complemento o la administración de nutrientes críticos retenidos del medio. El marcador seleccionable puede estar presente opcionalmente en un plásmido separado e introducido por la co-transfección.

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

Cada componente que se tenga que expresar en un vector multicistónico de expresión se puede separar, por ejemplo, por un elemento del sitio interno de entrada en el ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés) o un elemento vírico 2A, para permitir separar la expresión de las diversas proteínas del mismo promotor. Los elementos de IRES y los elementos 2A son conocidos en la técnica (Patente de EE.UU. N° 4.937.190; de Felipe et al. 2004. Traffic 5: 616-626). En una realización, los oligonucleótidos que codifican las secuencias del sitio de escisión de furina (RAKR) (Fang et al. 2005. Nat. Biotech 23: 584-590) unidos a las secuencias de tipo 2A del virus de las enfermedades de pies y boca (FMDV, por sus siglas en inglés), virus de la rinitis equina A (ERAV, por sus siglas en inglés) y virus Thosa Asigna (TaV, por sus siglas en inglés) (Szymczak et al. 2004. Nat. Biotechnol. 22: 589-594) son usados para separar elementos genéticos en un vector multicistónico. La eficacia de un vector multicistónico particular se puede ensayar fácilmente por la detección de la expresión de cada uno de los genes usando protocolos clásicos.

En un ejemplo específico, el genoma vírico del vector comprende: una secuencia del potenciador/promotor de citomegalovirus (CMV); las secuencias R y U5 de la LTR 5' de VIH; una secuencia de empaquetamiento (ψ); la señal del saliente de VIH-1; un potenciador interno; un promotor interno; un gen de interés; el elemento responsable del virus de la hepatitis de la marmota; una secuencia supresora ámbra de ARNt; un elemento U3 con una eliminación de su secuencia potenciadora; el aislante de β -globina de pollo y las secuencias R y U5 de la LTR 3' del VIH. En algunos ejemplos, el genoma del vector comprende una LTR 5' lentiviral intacta y una LTR 3' auto-inactivante. (Iwakuma et al. Virology 15: 120, 1999).

La construcción del genoma del vector se puede llevar a cabo usando cualquier técnica de ingeniería genética adecuada conocida en la técnica, incluyendo, sin limitación, las técnicas clásicas de digestión de endonucleasa de restricción, ligadura, transformación, purificación del plásmido y secuenciación de ADN, por ejemplo, como se describe en Sambrook et al. (1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.), Coffin et al. (Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. (1.997)) y "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed. Oxford University Press, (2.000)).

4. Producción de partículas víricas.

Se puede usar cualquiera de una variedad de métodos anteriormente conocidos en la técnica para producir partículas lentivirales infecciosas cuyo genoma comprende una copia de ARN del genoma del vector viral. En un método, el genoma del vector viral es introducido en una estirpe celular de empaquetamiento que contiene todos los componentes necesarios para empaquetar el ARN genómico vírico, transcrito a partir del genoma de vector vírico, en partículas víricas. Alternativamente, el genoma del vector viral puede comprender uno o más genes codificadores de componentes víricos, además de una o más secuencias de interés. Para prevenir la replicación del genoma en la célula diana, sin embargo, se retirarán normalmente los genes víricos endógenos requeridos para la replicación y se proporcionarán por separado en la estirpe celular de empaquetamiento.

En general, las partículas vectoriales lentivirales se producen por una estirpe celular que se transfecta con uno o más vectores plasmídicos que contienen los componentes necesarios para generar las partículas. Estas partículas vectoriales lentivirales no son típicamente competentes para la replicación, es decir, son sólo capaces de una sola vuelta de infección. Lo más frecuentemente, se utilizan múltiples vectores plasmídicos para separar los diversos componentes genéticos que generan las partículas vectoriales lentivirales, principalmente para reducir la posibilidad de procesos de recombinación que pudieran, de otro modo, generar la replicación de virus competentes. Sin embargo, se puede usar un solo vector plasmídico con los componentes lentivirales, si se desea. Como un ejemplo de un sistema que emplea múltiples vectores plasmídicos, se transfecta una estirpe celular con al menos un plásmido que contiene el genoma del vector viral (es decir, el plásmido del genoma del vector), incluyendo las LTR, la secuencia de empaquetamiento que actúa en cis y la secuencia o las secuencias de interés que, con frecuencia, se unen de manera operativa a un promotor heterólogo, al menos, un plásmido que codifica los componentes enzimáticos y estructurales del virus (es decir, el plásmido de empaquetamiento que codifica componentes tales como, Gag y Pol) y, al menos,

un plásmido de envoltura que codifica una glucoproteína de envoltura de Arbovirus. Se pueden usar plásmidos adicionales para mejorar la producción de partículas de retrovirus, por ej., plásmidos de expresión de Rev, como se describe en la presente memoria y se conoce en la técnica. Las partículas víricas brotan a través de la membrana celular y comprenden un núcleo que incluye un genoma que contiene la secuencia de interés y una glucoproteína de envoltura de Arbovirus que reconoce a las células dendríticas. Cuando la glucoproteína de Arbovirus es una glucoproteína E2 del virus Sindbis, se logra que la glucoproteína presente una unión reducida con el sulfato de heparán, comparado con la cepa HR de referencia.

La transfección de células de empaquetamiento con vectores plasmídicos de la presente invención se puede llevar a cabo por métodos conocidos y el método que se tiene que usar no está limitado de ningún modo. Se conoce una serie de sistemas de administración no víricos en la técnica, incluyendo por ejemplo, electroporación, sistemas de administración a base de lípidos incluyendo liposomas, administración de ADN "desnudo" y administración usando compuestos de políciclodextrina, tales como los descritos en Schatzlein AG. (2001. Non-Viral Vectors in Cancer Gene Therapy: Principles and Progresses. Anticancer Drugs). Se emplean típicamente métodos de tratamiento de lípidos o sales catiónicas, véase, por ejemplo, Graham et al. (1973. Virol. 52: 456; Wigler et al. (1979. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1373-76)). El método de precipitación con fosfato de calcio es el más usado con frecuencia. Sin embargo, también se pueden usar otros métodos para introducir el vector en células, incluyendo microinyección nuclear y la fusión de protoplastos bacterianos.

La estirpe celular de empaquetamiento proporciona los componentes, incluyendo proteínas reguladoras y estructurales víricas, que son requeridas en *trans* para el empaquetamiento del ARN genómico vírico en partículas del vector lentiviral. La estirpe celular de empaquetamiento puede ser cualquier estirpe celular que sea capaz de expresar proteínas lentivirales y producir partículas del vector lentiviral funcionales. Algunas estirpes celulares de empaquetamiento adecuadas incluyen las células 293 (ATCC CCL X), 293T, HeLa (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) y Cf2Th (ATCC CRL 1430). La estirpe celular de empaquetamiento puede expresar de manera estable las proteínas víricas necesarias. Dicha estirpe celular de empaquetamiento se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N° 6218181. Alternativamente, se puede transfectar de manera transitoria una estirpe celular de empaquetamiento con moléculas de ácido nucleico que codifiquen una o más proteínas víricas necesarias junto con el genoma del vector vírico. Las partículas víricas resultantes se recogieron y se usaron para infectar una célula diana. El gen o los genes que codifican la glucoproteína o las glucoproteínas de envoltura se clonan normalmente en un vector de expresión, tal como un pcDNA3 (Invitrogen, CA EE.UU.). Los vectores de expresión de células eucariotas son conocidos en la técnica y están disponibles en una serie de fuentes comerciales. Las células de empaquetamiento, tales como las células 293T se co-transfectan después con el genoma del vector viral que codifica una secuencia de interés (típicamente, que codifica un antígeno), al menos un plásmido que codifica componentes de empaquetamiento del virus y un vector para la expresión de la molécula diana. La envoltura se expresa sobre la membrana de la célula de empaquetamiento y se incorpora al vector vírico.

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

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

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

C. Suministro del Virus.

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

Alternativamente, se proporcionan células diana y se ponen en contacto con el virus in vitro, tal como en placas de cultivo. Las células diana son típicamente poblaciones de células que comprenden células dendríticas obtenidas a partir de un individuo sano o un individuo con necesidad de tratamiento o en el que se desea estimular una respuesta inmunitaria frente a un antígeno. Los métodos para obtener células de un individuo son conocidos en la técnica e incluyen flebotomía, escisión quirúrgica y biopsia. También se pueden generar las CD humanas por la obtención de progenitores hematopoyéticos humanos CD34 α ⁺ y usando un método de cultivo in vitro como se ha descrito en otras publicaciones (por ej., Banchereau et al. Cell 106, 271-274 (2001)).

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

En su administración, tanto in vivo como in vitro, se puede usar una alícuota de las partículas víricas que contenga suficiente número para infectar las células diana deseadas. Cuando se tiene que cultivar una célula diana, la concentración de las partículas víricas es, en general, al menos 1 UI/ μ l, más preferiblemente al menos 10 UI/ μ l, incluso, más preferiblemente, al menos 300 UI/ μ l, incluso, más preferiblemente, al menos 1X10⁴ UI/ μ l, incluso, más preferiblemente, al menos 1X10⁵ UI/ μ l, incluso, más preferiblemente, al menos 1X10⁶ UI/ μ l o incluso, más preferiblemente, al menos 1X10⁷ UI/ μ l.

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

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

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

Los métodos de infección de células descritos anteriormente no dependen de las características específicas del individuo de las células. Como resultado, se extienden fácilmente a una variedad de especies animales. En algunos casos, se suministran partículas víricas a un ser humano o a células dendríticas humanas y, en otros casos, se suministran a un animal, tal como un ratón, caballo, perro, gato o ratón o a aves. Como se discute en la presente memoria, el genoma del vector viral es pseudogenotipado para conferirle una amplia gama de huéspedes, así como cierta especificidad de las células diana. Cualquier experto en la materia también está al tanto de los promotores internos apropiados y otros elementos que consiguen la expresión deseada de la secuencia de interés en una especie animal particular. Así, cualquier experto en la materia podrá modificar el método de infección de las células dendríticas a partir de cualquier especie.

D. Inmunizaciones terapéuticas y profilácticas.

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

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

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

Son conocidos los antígenos asociados a tumores para una variedad de cánceres incluyendo, por ejemplo, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, melanoma y cáncer de mama. En algunos cánceres de mama, por ejemplo, el receptor de Her-2 se sobreexpresa en la superficie de las células cancerosas. Los antígenos de tumores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, MAGE, BAGE, RAGE y NY-ESO-1, que son antígenos no mutados expresados en las áreas privilegiadas inmunitarias de los ensayos y en una variedad de células tumorales; antígenos de tumores específicos del linaje tales como los antígenos del linaje de melanocitos-melanoma MART-1/Melan-A, gp100, gp75, mda-7, proteína tirosinasa y relacionada con la tirosinasa, carcinoma de células renales - 5T4, SM22-alfa, anhidrasas carbónicas I y IX (también conocidas como G250), factores inducibles por hipoxia (por ej., HIF-1alfa y HIF-2alfa), VEGF o el antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA, por sus siglas en inglés), el antígeno específico de la próstata (PSA, por sus siglas en inglés), fosfatos ácidos prostáticos y el antígeno epitelial de seis dominios transmembrana (STEAP, por sus siglas en inglés), NKX3.1, que son antígenos expresados en células normales y neoplásicas derivadas del mismo tejido; proteínas/péptidos de epítomos derivados de genes mutados en células tumorales o genes transcritos a diferentes niveles en el tumor comparado con células normales, tales como la enzima telomerasa, survivina, mesotelina, ras mutado, reorganización de bcr/abl, Her2/neu, p53 mutado o de cepa natural, citocromo P450 1B1 y secuencias de intrones expresadas anormalmente tales como N-acetilglucosaminiltransferasa-V; reordenaciones clónicas de genes de inmunoglobulina que generan idiotipos únicos en el mieloma y linfomas de células B; proteínas/péptidos de epítomos derivados de procesos oncovíricos, tales como las proteínas del virus del papiloma humano E6 y E7; proteínas oncofetales no mutadas con una expresión selectiva del tumor, tal como el antígeno carcinoembrionario y alfa-fetoproteína. Se ha revisado una serie de antígenos asociados a tumores (véase, por ejemplo, "Tumor-Antigens Recognized By T-Lymphocytes," Boon T, Cerottini J C, Vandeneuynde B, Vanderbruggen P, Vanel A, Annual Review Of Immunology 12: 337-365, 1994; "A listing of human tumor antigens recognized by T cells," Renkvist N, Castelli C, Robbins P F, Parmiani G. Cancer Immunology Immunotherapy 50: (1) 3-15 de marzo de 2.001).

El antígeno también puede ser un antígeno asociado a una enfermedad infecciosa, tal como, por ejemplo, VIH/SIDA. El antígeno puede ser, por ejemplo, gp120 (Klimstra, W. B. et al. 2003. J Virol 77: 12022-12032; Bernard, K. A., et al. 2000. Virology 276: 93-103; Byrnes, A. P., et al. 1998. J Virol 72: 7349-7356). Otros antígenos ilustrativos incluyen, pero no se limitan, a: gag, pol, env, tat, nef y rev (Lieberman, J. et al. 1997. AIDS Res Hum Retroviruses 13 (5): 383-392; Menendez-Arias, L. et al. 1998. Viral Immunol 11 (4): 167-181).

Los ejemplos de antígenos víricos incluyen, entre otros, polipéptidos de adenovirus, polipéptidos de alfavirus, polipéptidos de calicivirus, por ej., un antígeno de la cápside de calicivirus, polipéptidos de coronavirus, polipéptidos de virus del distemper, polipéptidos del virus de Ebola, polipéptidos de enterovirus, polipéptidos de flavivirus, polipéptidos del virus de la hepatitis (AE), por ej., un antígeno del núcleo o de superficie de la hepatitis B o una glucoproteína E1 o E2 del virus de la hepatitis C, proteínas del núcleo o no estructurales, polipéptidos del virus del herpes, por ej., una glucoproteína del virus del herpes simple o de virus de la varicela zóster, polipéptidos del virus de

la inmunodeficiencia, por ej., la envoltura o proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana, polipéptidos del virus de la peritonitis infecciosa, polipéptidos del virus de la influenza, por ej., una hemaglutinina de la influenza A, neuraminidasa o nucleoproteína, polipéptidos del virus de la leucemia, polipéptidos del virus de Marburg, polipéptidos de ortomixovirus, polipéptidos del virus del papiloma, polipéptidos del virus de la parainfluenza, por ej., la hemaglutinina/neuraminidasa, polipéptidos de paramixovirus, polipéptidos de parvovirus, polipéptidos de pestivirus, polipéptidos del virus de picorna, por ej., un polipéptido de la cápside del virus de la polio, polipéptidos del virus de la viruela, por ej., un polipéptido del virus vaccinia, polipéptidos del virus de la rabia, por ej., una glucoproteína G del virus de la rabia, polipéptidos de reovirus, polipéptidos de retrovirus y polipéptidos de rotavirus.

Los ejemplos de antígenos bacterianos incluyen, entre otros, polipéptidos de Actinomyces, polipéptidos de Bacillus, polipéptidos de Bacteroides, polipéptidos de Bordetella, polipéptidos de Bartonella, polipéptidos de Borrelia, por ej., OspA de B. burgdorferi, polipéptidos de Brucella, polipéptidos de Campylobacter, polipéptidos de Capnocytophaga, polipéptidos de Chlamydia, polipéptidos de Clostridium, polipéptidos de Corynebacterium, polipéptidos de Coxiella, polipéptidos de Dermatophilus, polipéptidos de Enterococcus, polipéptidos de Ehrlichia, polipéptidos de Escherichia, polipéptidos de Francisella, polipéptidos de Fusobacterium, polipéptidos de Haemobartonella, polipéptidos de Haemophilus, por ej., proteína de la membrana externa de H. influenzae tipo b, polipéptidos de Helicobacter, polipéptidos de Klebsiella, polipéptidos de bacterias en forma de L, polipéptidos de Leptospira, polipéptidos de Listeria, polipéptidos de Mycobacteria, polipéptidos de Mycoplasma, polipéptidos de Neisseria, polipéptidos de Neorickettsia, polipéptidos de Nocardia, polipéptidos de Pasteurella, polipéptidos de Peptococcus, polipéptidos de Peptostreptococcus, polipéptidos de Pneumococcus, polipéptidos de Proteus, polipéptidos de Pseudomonas, polipéptidos de Rickettsia, polipéptidos de Rochalimaea, polipéptidos de Salmonella, polipéptidos de Shigella, polipéptidos de Staphylococcus, polipéptidos de Streptococcus, por ej., proteínas M de S. pyogenes, polipéptidos de Treponema y polipéptidos de Yersinia, por ej., antígenos de Y. pestis F1 y V.

Los ejemplos de antígenos fúngicos incluyen, entre otros, polipéptidos de Absidia, polipéptidos de Acremonium, polipéptidos de Alternaria, polipéptidos de Aspergillus, polipéptidos de Basidiobolus, polipéptidos de Bipolaris, polipéptidos de Blastomyces, polipéptidos de Candida, polipéptidos de Coccidioides, polipéptidos de Conidiobolus, polipéptidos de Cryptococcus, polipéptidos de Curvalaria, polipéptidos de Epidermophyton, polipéptidos de Exophiala, polipéptidos de Geotrichum, polipéptidos de Histoplasma, polipéptidos de Madurella, polipéptidos de Malassezia, polipéptidos de Microsporum, polipéptidos de Moniliella, polipéptidos de Mortierella, polipéptidos de Mucor, polipéptidos de Paecilomyces, polipéptidos de Penicillium, polipéptidos de Phialemonium, polipéptidos de Phialophora, polipéptidos de Prototheca, polipéptidos de Pseudallescheria, polipéptidos de Pseudomicrodochium, polipéptidos de Pythium, polipéptidos de Rhinospodium, polipéptidos de Rhizopus, polipéptidos de Scolecobasidium, polipéptidos de Sporothrix, polipéptidos de Stemphylium, polipéptidos de Trichophyton, polipéptidos de Trichosporon y polipéptidos de Xylohypha.

Los ejemplos de antígenos de parásitos protozoarios incluyen, entre otros, polipéptidos de Babesia, polipéptidos de Balantidium, polipéptidos de Besnoitia, polipéptidos de Cryptosporidium, polipéptidos de Eimeria, polipéptidos de Encephalitozoon, polipéptidos de Entamoeba, polipéptidos de Giardia, polipéptidos de Hammondia, polipéptidos de Hepatozoon, polipéptidos de Isospora, polipéptidos de Leishmania, polipéptidos de Microsporidia, polipéptidos de Neospora, polipéptidos de Nosema, polipéptidos de Pentatrichomonas, polipéptidos de Plasmodium, por ej., P. falciparum circumsporozoite (PfCSP), proteína 2 de superficie de esporozoito (PfSSP2), extremo carboxilo del antígeno 1 del estado del hígado (PfLSA1 c-term) y proteína 1 exportada (PfExp-1), polipéptidos de Pneumocystis, polipéptidos de Sarcocystis, polipéptidos de Schistosoma, polipéptidos de Theileria, polipéptidos de Toxoplasma y polipéptidos de Trypanosoma.

Los ejemplos de antígenos de parásitos helmínticos incluyen, entre otros, polipéptidos de Acanthocheilonema, polipéptidos de Aelurostrongylus, polipéptidos de Ancylostoma, polipéptidos de Angiostrongylus, polipéptidos de Ascaris, polipéptidos de Brugia, polipéptidos de Bunostomum, polipéptidos de Capillaria, polipéptidos de Chabertia, polipéptidos de Cooperia, polipéptidos de Crenosoma, polipéptidos de Dictyocaulus, polipéptidos de Dioctophyme, polipéptidos de Dipetalonema, polipéptidos de Diphylobothrium, polipéptidos de Diplydium, polipéptidos de Dirofilaria, polipéptidos de Dracunculus, polipéptidos de Enterobius, polipéptidos de Filaroides, polipéptidos de Haemonchus, polipéptidos de Lagochilascaris, polipéptidos de Loa, polipéptidos de Mansonella, polipéptidos de Muellerius, polipéptidos de Nanophyetus, polipéptidos de Necator, polipéptidos de Nematodirus, polipéptidos de Oesophagostomum, polipéptidos de Onchocerca, polipéptidos de Opisthorchis, polipéptidos de Ostertagia, polipéptidos de Parastrongylus, polipéptidos de Paragonimus, polipéptidos de Parascaris, polipéptidos de Physaloptera, polipéptidos de Protostrongylus, polipéptidos de Setaria, polipéptidos de Spirocera, polipéptidos de Spirometra, polipéptidos de Stephanofilaria, polipéptidos de Strongyloides, polipéptidos de Strongylus, polipéptidos de Thelazia, polipéptidos de Toxascaris, polipéptidos de Toxocara, polipéptidos de Trichinella, polipéptidos de Trichostrongylus, polipéptidos de Trichuris, polipéptidos de Uncinaria y polipéptidos de Wuchereria.

Los ejemplos de antígenos de ectoparásitos incluyen, entre otros, polipéptidos (incluyendo antígenos protectores así como alérgenos) de pulgas; garrapatas, incluyendo garrapatas duras y garrapatas blandas; moscas, tales como quironómidos, mosquitos, moscas de la arena, simúlidos, tábanos, moscas de los cuernos, moscas del venado, moscas tsetsé, moscas de los establos, moscas causantes de miasis y mosquitos mordedores; hormigas; arañas, piojos; ácaros y chinches verdaderas, tales como chinches y vinchucas.

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

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

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

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

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

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

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

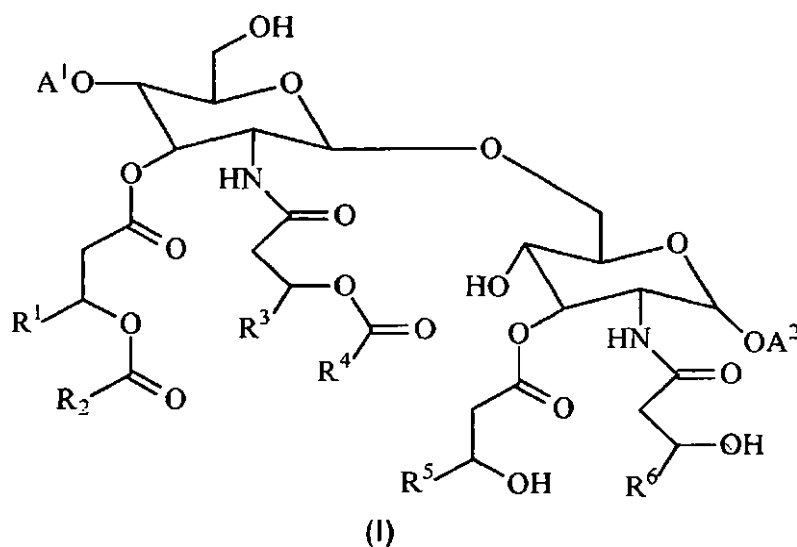
Las vacunas, con frecuencia, incluyen un adyuvante. Las partículas vectoriales lentivirales descritas en la presente memoria también se pueden administrar junto con un adyuvante. El adyuvante se puede administrar con las partículas del virus recombinante, antes de las partículas del virus recombinante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

Se puede usar una variedad de adyuvantes junto con el virus para provocar una respuesta inmunitaria frente al antígeno codificado en el genoma del vector viral. Los adyuvantes preferidos aumentan la respuesta intrínseca frente a los antígenos sin causar cambios conformacionales en el antígeno que afecten a la forma cualitativa de la respuesta. Los adyuvantes preferidos incluyen alumbre, monofosforil lípido A 3 Des-O-acilado (MPL, por sus siglas en inglés)

(véase la patente británica GB 2220211). QS21 es un glucósido de triterpeno o saponina aislado de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina, encontrado en América del Sur (véase Kensil et al., en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell and Newman, Plenum Press, NY, 1.995); Patentes de EE.UU. N° 5.057.540). Otros adyuvantes son emulsiones de aceite en agua (tal como escualeno o aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunitarios, tales como el monofosforil lípido A (véase Stoute et al., N. Engl. J. Med. 336, 86-91 (1.997)). Otro adyuvante es el CpG (Bioworld Today, 15 de noviembre de 1998). Alternativamente, A β se puede acoplar a un adyuvante. Por ejemplo, una versión del lipopéptido de A β se puede preparar por acoplamiento del ácido palmítico u otros lípidos directamente al extremo N-terminal de A β , como se describe para la vacunación de antígenos de la hepatitis B (Livingston, J. Immunol. 159, 1383-1392 (1997)). Sin embargo, dicho acoplamiento no debería cambiar sustancialmente la conformación de A β a fin de afectar a la naturaleza de la respuesta inmunitaria al mismo. Se pueden administrar adyuvantes como componente de una composición terapéutica con un agente activo o se pueden administrar por separado, antes, al mismo tiempo con la administración del agente terapéutico o después de ésta.

Una clase de adyuvantes son las sales de aluminio (alumbre), tales como el hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio. Dichos adyuvantes se pueden usar con otros agentes inmunoestimuladores específicos o sin estos, tales como el MPL o 3-DMP, QS21, aminoácidos poliméricos o monoméricos, tales como el ácido poliglutámico o la polilisina. Otra clase de adyuvantes son las formulaciones de emulsión de aceite-en-agua. Dichos adyuvantes se pueden usar con otros agentes inmunoestimuladores específicos o o sin estos, tales como los péptidos de muramilo (por ej., N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'dipalmitoil-sn- -glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxi propilamida (DTP-DPP) teramida.TM.) u otros componentes de la pared celular bacteriana. Las emulsiones de aceite-en-agua incluyen (a) MF59 (patente internacional WO 90/14837), que contienen 5% de Escualeno, 0,5% de Tween 80 y 0,5% de Span 85 (que contiene opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE) formulados en partículas submicrométricas, usando un microfluidizador tal como un microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton Mass.), (b) SAF, que contiene 10% de Escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero L121 bloqueado con plurónico y thr-MDP, microfluidizado en una emulsión en submicrómetros o sometido a agitador vorticial para generar una emulsión de tamaño de partícula mayor y (c) un sistema adyuvante de Ribí (RAS, por sus siglas en inglés), (Ribí Inmunicen, Hamilton, Monte.) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80 y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en: monofosforilípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS, por sus siglas en inglés), preferiblemente MPL+CWS (Detox™). Otra clase de adyuvantes preferidos son los adyuvantes de saponina, tales como el Stimulon. TM. (QS21, Aquila, Worcester, Mass.) o partículas las generadas a partir de tales como los ISCOM (complejos inmunoestimulantes) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen el Adyuvante Completo de Freund (CFA, por sus siglas en inglés) y el Adyuvante Incompleto de Freund (IFA, por sus siglas en inglés). Otros adyuvantes incluyen las citocinas, tales como las interleucinas (IL-1, IL-2 e IL-12), el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF, por sus siglas en inglés), el factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés).

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



en la que los restos A¹ y A² se seleccionan independientemente del grupo de: hidrógeno, fosfato y sales de fosfato. Sodio y potasio son contraiones ilustrativos para las sales de fosfato. Los restos R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ se seleccionan independientemente del grupo de hidrocarbilo con 3 a 23 carbonos, representado por C₃-C₂₃. Para una mayor aclaración, se explicará que cuando un resto se "selecciona independientemente de" un grupo especificado con múltiples miembros, se debería entender que el miembro elegido para el primer resto no impacta o limita de ningún

modo la elección del miembro seleccionado para el segundo resto. Los átomos de carbono a los que se unen R¹, R³, R⁵ y R⁶ son asimétricos y, así, pueden existir en cualquier estereoquímica R o S. En una realización, todos esos átomos de carbono presentan la estereoquímica R, mientras que, en otra realización, todos esos átomos de carbono presentan la estereoquímica S.

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

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

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

30 E1: A₁ es un fosfato o una sal de fosfato y A₂ es hidrógeno.
E2: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₃-C₂₁ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₅-C₂₃.
E3: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₅-C₁₇ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₇-C₁₉.
E4: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₇-C₁₅ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₉-C₁₇.
E5: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₉-C₁₃ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₁₁-C₁₅.
35 E6: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₉-C₁₅ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₁₁-C₁₇.
E7: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₇-C₁₃ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₉-C₁₅.
E8: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁-C₂₀ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₁₂-C₂₀.
E9: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son alquilo C₁₁ y R² y R⁴ son hidrocarbilo C₁₃.
E10: R¹, R³, R⁵ y R⁶ son undecilo y R² y R⁴ son tridecilo.

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

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

Se puede administrar un adyuvante con el virus de la invención como una única composición o se puede administrar antes, al mismo tiempo o después de la administración del virus recombinante de la invención. Se puede empaquetar y suministrar un inmunógeno y un adyuvante en el mismo vial o se pueden empaquetar en viales separados y mezclarse antes de su uso. El inmunógeno y el adyuvante se envasan típicamente con una etiqueta que indica la
50 aplicación terapéutica deseada. Si se envasan por separado el inmunógeno y el adyuvante, el envasado incluye típicamente instrucciones para mezclarlos antes de su uso. La elección de un adyuvante y/o un vehículo depende de la estabilidad de la vacuna que contiene el adyuvante, la vía de administración, el plan de dosificación, la eficacia del

adyuvante para las especies que se vacunan y, en los seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es uno que ha sido homologado o se puede homologar para su administración a seres humanos por los órganos reguladores pertinentes. Por ejemplo, el adyuvante Completo de Freund no es adecuado para su administración en seres humanos. Se prefieren alumbre, MPL y QS21. Opcionalmente, se pueden usar dos o más adyuvantes diferentes de manera simultánea, tal como alumbre con MPL, alumbre con QS21, MPL con QS21 y alumbre, QS21 y MPL juntos. También, se puede usar adyuvante Incompleto de Freund (Chang et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), opcionalmente en combinación con cualquiera de alumbre, QS21 y MPL y todas las combinaciones de los mismos.

E. Composiciones farmacéuticas y estuches.

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

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

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

Los kits que comprenden los polinucleótidos que codifican los genes de interés (típicamente un antígeno) también se consideran en la presente memoria. El kit puede incluir, al menos, un plásmido que codifique componentes de empaquetamiento de virus y el vector que codifica la variante glucoprotéica E2 del virus Sindbis. Algunos kits contendrán, al menos, un plásmido que codifique los componentes de empaquetamiento del virus un vector que codifique la variante glucoprotéica E2 del virus Sindbis y un vector que codifique al menos un factor de maduración de CD.

Los kits que comprenden un vector vírico codificador de una secuencia de interés (típicamente un antígeno) y, opcionalmente, una secuencia de polinucleótidos codificadora de un factor de maduración de CD también se consideran en la presente memoria. En algunos kits, el kit incluye al menos un plásmido que codifica los componentes de empaquetamiento del virus y un vector codificador de la variante glucoprotéica E2 del virus Sindbis.

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

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

Los kits proporcionados en la presente memoria también pueden incluir un dispositivo para la administración de un compuesto, tal como un promotor o estimulador de CD, a un individuo. Se puede incluir cualquiera de una variedad de dispositivos conocidos en la técnica para la administración de medicamentos a un individuo en los kits proporcionados en la presente memoria. Los dispositivos ilustrativos incluyen una aguja hipodérmica, una aguja intravenosa, un catéter, una inyección sin aguja, entre otros, una aguja hipodérmica, una aguja intravenosa, un catéter, un dispositivo de inyección sin aguja, un inhalador y un dispensador líquido tal como un gotero. Típicamente, el dispositivo para la administración del compuesto del kit será compatible con el método de administración deseado del compuesto.

Los siguientes ejemplos se ofrecen como ilustración y no son limitantes.

Ejemplos

Ejemplos 1

Modificación de una variante de envoltura del virus Sindbis.

5 El virus Sindbis (VS)--un miembro del género Alphavirus y la familia Togaviridae --es capaz de infectar las CD, probablemente a través de CD-SIGN (Klimstra, W. B., et al. 2003. J. Virol. 77: 12022-12032). El receptor vírico canónico para la cepa de laboratorio de VS, sin embargo, es el sulfato de heparán de la superficie celular (SH), que se encuentra en muchos tipos de células (Strauss, J. H., et al. 1994. Arch. Virol. 9: 473-484; Byrnes, A. P., y D. E. Griffin. 1998. J. Virol. 72: 7349-7356). Para intentar reducir la unión del sulfato de heparán, se construyó una envoltura de E2 mutante (denominada SVGmu) por Wang et al. (Patente de EE.UU. 2008/0019998). Parte de su estrategia implicaba la eliminación de cuatro aminoácidos en la unión de pro-proteína E3/E2 y una eliminación de dos aminoácidos con una adición posterior de una secuencia de 10 aminoácidos a partir de la hemaglutinina (véanse las Figuras 1A y 1B). La proteína E2 resultante se expresa como una fusión de E3 y E2 (también conocida como pE2) debido a que se rompió la secuencia de escisión natural y también muestra un epítipo extraño (hemaglutinina). Como se muestra a continuación, SVGmu experimenta bajos niveles de expresión, entre otros problemas.

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

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

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

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

5 Ejemplo 2

Preparación de una partícula de vector vírico que comprende una variante glucoprotéica de envoltura E2 del virus Sindbis.

Se prepara un virus pseudogenotipado de envoltura Sindbis por transfección clásica transitoria mediada por fosfato de calcio de células 293T con un vector lentiviral, tal como FUGW o sus derivados, empaquetando plásmidos que codifican gag, pol y rev, y una secuencia de envoltura del virus Sindbis de la variante. FUGW es un vector lentiviral auto-inactivante que soporta el promotor de ubiquitina-C humana para conducir la expresión de un gen indicador de GFP (Lois, C., et al. 2002. Science 295: 868-872). Los vectores lentivirales de transferencia (FUGW y sus derivados) son vectores lentivirales a base VIH de tercera generación (véase, en general, Cockrell and Kafri Mol. Biotechnol. 36: 184, 2007), en el que se suprime la mayor parte de la región U3 de la LTR 3', dando como resultado una LTR 3' auto-inactivante.

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

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

de la -transfección. Se centrifugaron los sobrenadantes del cultivo a baja velocidad (126 rad/s (1200 rpm)) para sedimentar las partículas celulares, seguido por una filtración a través de filtros de 0,45 µm. El líquido filtrado que contenía la preparación del vector lentiviral se concentró, opcionalmente, por centrifugación a 17.700 x g durante 5 horas a 20°C. El vector lentiviral sedimentado se resuspendió después en PBS en un volumen deseado. Este procedimiento proporcionó típicamente $\geq 5 \times 10^5$ UI/ml usando la envoltura de glucoproteína del virus Sindbis descrita en la presente memoria o 5×10^7 UI totales para cada cultivo del frasco rotativo. Más típicamente, este procedimiento proporcionó al menos 1×10^8 UI totales para cada cultivo de frasco rotativo.

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

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

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

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

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

Ejemplo 3

Producción de partículas vectoriales lentivirales que comprenden glucoproteínas de envoltura del virus Sindbis.

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

Se generaron partículas vectoriales lentivirales pseudogenotipadas de glucoproteínas del virus Sindbis por transfección de células 293T como se describe en el Ejemplo 2. Se recogieron los sobrenadantes brutos 48 horas después de la transfección y se usaron para transducir células 293T que expresaban CD-SIGN humana (293-CDSIGN) que se habían puesto en placas de 6 pocillos el día anterior a 2×10^5 células/pocillo. Se determinó el título después de una incubación de 72 h a 37°C analizando las células transducidas en un citómetro Guava Easy-Cyte (Millipore). Se contaron 25.000 procesos totales para determinar el porcentaje de células transducidas GFP+, que se usó, a su vez, para calcular el título GFP (UI, unidades infecciosas) para cada virus.

Para facilitar el estudio de la transducción diana, se construyen estirpes celulares que expresan CD-SIGN humanas. Las estirpes celulares son generadas por la transducción estable de células 293T progenitoras con un lentivector pseudogenotipado VSVG que contiene la secuencia codificadora para CD-SIGN humana. Se multiplica el ADNc para CD-SIGN humana a partir de plásmidos pUNO-hCDSIGN1Aa (InvivoGene) y se clonó cadena abajo del promotor de ubiquitina-C humana en el plásmido lentiviral FUW para generar FUW-hCDSIGN. Alternativamente, se generan estirpes celulares por transducción estable de células 293T progenitoras con un vector (no lentiviral) anfotrópico pseudogenotipado de VSVG que contiene la secuencia codificadora para CD-SIGN, para facilitar mejor el análisis de transducción basado en ácidos nucleicos cadena abajo por las partículas del vector lentiviral. Los lentivectores, o vectores anfotrópicos, se pseudogenotipan después con VSVG y se usan para transducir células 293T. Alternativamente, se generan estirpes celulares por la transducción estable de células 293T progenitoras con un

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 4

20 Inmunogenicidad de partículas vectoriales lentivirales que comprenden glucoproteínas de envoltura del virus Sindbis.

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

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

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

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

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

Ejemplo 5

Construcción de vectores lentivirales de no integración (NILV).

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

Una vista con zoom de la región U3 se muestra a continuación como una caja abierta con la secuencia del PPT (tracto de polipurina) inmediatamente cadena arriba. A continuación se muestran tres diferentes regiones U3 en forma esquemática; sus secuencias se muestran en la Figura 5B y las SEQ ID Nos: 21-23. Las construcciones contienen eliminaciones en las regiones U3. La construcción SIN presenta una eliminación de aproximadamente 130 nucleótidos en la U3 (Miyoshi, et al. J Virol 72: 8150, 1998; Yu et al. PNAS 83: 3194, 1986), que elimina la caja TATA, que suprime la actividad del promotor LTR. Las eliminaciones en las construcciones 703 y 704 aumentan la expresión de los vectores lentivirales (Bayer et al. Mol Therapy 16: 1968, 2008). Además, la construcción 704 contiene una eliminación del PPT 3', que disminuye la integración del vector (patente internacional WO 2009/076524). Las secuencias de la región U3 de todas las construcciones se muestran en la figura 5B. La PPT 3' empieza en la posición 3 y se muestran las eliminaciones extendidas relativas al vector suprimido de SIN.

Ejemplo 6

Expresión en células dendríticas después de la transducción con partículas vectoriales lentivirales.

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

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

10 Se obtuvieron resultados similares con los dos promotores UbiC (Figura 6, panel A) y CMV (Figura 6, panel B). Los vectores lentivirales que contenían eliminaciones de U3 extendidas (703 y 704) mostraron una expresión de transgenes total mayor respecto a los vectores con SIN eliminado. La eliminación del PPT en la construcción 704 disminuyó la expresión ligeramente con respecto a la construcción 703.

Ejemplo 7

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

Este ejemplo demuestra la eficacia de la integración relativa de vectores pseudogenotipados SIN-Var1 que contienen combinaciones de diferentes eliminaciones del vector con una integrasa deficiente o natural, después de la transducción de las células 293-CD-SIGN.

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

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

Ejemplo 8

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

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

Se inmunizaron ratones C57BL/6 por vía subcutánea con $2,5 \times 10^{10}$ genomas de lentivector de integración (Int^{wt}) o no integración (Int^{D64V}) que codificaban el antígeno Gag a partir del virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV). El número y la función de células T CD8 específicas de Gag de SIV en el bazo se determinó el día 10 por tinción intracelular de citocinas, como se describió anteriormente, con la excepción de que el péptido derivado de Gag de SIV AAVKNWMTQTL se usó para una nueva estimulación. La Figura 8 ilustra que los lentivectores de no integración puedan provocar una respuesta de células T CD8 equivalente a la de los lentivectores de integración. Por otra parte, el patrón de expresión de citocina es similar.

Ejemplo 9

La inmunización con DC-NILV proporciona un efecto terapéutico.

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

Se inyectaron a ratones BALB/c por vía subcutánea 2×10^4 células de carcinoma de colon CT26. Un día después, los

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

Las realizaciones de la invención incluyen, entre otras, las siguientes.

1. Un agente retroviral, por ejemplo, una partícula vectorial lentiviral, que comprende:

(a) una envoltura que contiene una glicoproteína E2 del virus Sindbis de la SEQ ID N°: 1 en la que 160X no está o es un aminoácido distinto del ácido glutámico, o una variante de la SEQ ID N°: 1 capaz de infectar células dendríticas que tengan al menos una identidad de secuencia de 80% con SEQ ID NO: 1; en donde dicha glicoproteína E2 o su variante no fusionada a E3; y

(b) un genoma lentiviral que comprende una secuencia de interés.

2. La partícula del vector retroviral de la realización 1, en la que la glicoproteína o variante E2 se une a DC-SIGN.

3. La partícula del vector retroviral de la realización 1 o la realización 2, en la que el 160X está ausente o es glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina, tal como se selecciona de glicina, valina, leucina o isoleucina.

4. La partícula del vector retroviral de la realización 1 o la realización 2, en la que 160X es glicina.

5. La partícula del vector retroviral de la realización 1, 2, 3 ó 4, en la que la variante de la glicoproteína E2 tiene al menos un aminoácido modificado para reducir su carga neta positiva.

6. La partícula del vector retroviral de la realización 5, en la que los aminoácidos modificados se eligen del grupo que consiste en lisina 70, lisina 76 o lisina 159 de la SEQ ID NO: 1, y las sustituciones se eligen opcionalmente, de manera independiente, del ácido glutámico o del ácido aspártico.

7. La partícula del vector retroviral de la realización 1, 2, 3, 4, 5 ó 6, en la que la secuencia variante de E2 es la SEQ ID N° 2, 3 ó 4; (variantes 1, 2 y 3), que comprenden opcionalmente una o más sustituciones, inserciones o eliminaciones adicionales.

8. La partícula del vector retroviral de la realización 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7, que es una variante en la que la secuencia de los residuos 71-75 de la SEQ ID NO: 1 no se modifica o tiene una o dos sustituciones que no afectan a la capacidad de la variante para infectar CD, pero no alteran el número de aminoácidos en esta región.

Cualquier combinación de las realizaciones anteriores está contemplada por la invención, como se establece en las siguientes combinaciones no limitativas, donde ">" indica una referencia a la realización numerada anterior: 4>2>1; 5>4>1; 5>4>2>1; 5>3>1; 5>3>2>1; 6>5>4>1; 6>5>4>2>1; 6>5>3>2>1; 6>4>2>1; 6>3>2>1; 6>5>3>1; 7>6>5>4>1; 7>6>5>4>2>1; 7>6>5>3>1; 7>6>5>3>2>1; 7>6>4>2>1; 7>5>4>1; 7>5>4>2>1; 7>5>3>1; 7>5>3>2>1; 7>4>2>1; 7>3>2>1; 7>6>4>1; 7>6>4>2>1; 7>6>3>1; 7>6>3>2>1; 7>6>2>1; 8>4>2>1; 8>5>4>1; 8>5>4>2>1; 8>5>3>1; 8>5>3>2>1; 8>6>5>4>1; 8>6>5>4>2>1; 8>6>5>3>2>1; 8>6>4>2>1; 8>6>3>2>1; 8>6>5>3>1; 8>7>6>5>4>1; 8>7>6>5>4>2>1; 8>7>6>5>3>1; 8>7>6>5>3>2>1; 8>7>6>4>2>1; 8>7>5>4>1; 8>7>5>4>2>1; 8>7>5>3>1; 8>7>5>3>2>1; 8>7>4>2>1; 8>7>3>2>1; 8>7>6>4>1; 8>7>6>3>1; 8>7>6>3>2>1; 8>7>6>2>1.

Otras realizaciones de la invención incluyen:

9. La partícula del vector retroviral de cualquiera de las realizaciones anteriores, en la que la secuencia de interés codifica un antígeno específico de tumor o un antígeno derivado de virus, tal como un antígeno de VIH o SIV.

10. Un genoma de un agente retroviral, por ejemplo, un vector lentiviral, pseudogenotipado en una envoltura que comprende una variante de glicoproteína E2 del virus Sindbis, comprendiendo el genoma una secuencia de interés,

en donde la variante de la glicoproteína E2 facilita la infección de las células dendríticas por la partícula del vector retroviral; y en la que la variante de la glicoproteína E2 tiene una secuencia de aminoácidos como se define en una cualquiera de las realizaciones 1 a 9 anteriores.

11. Un sistema de empaquetamiento del vector retroviral para producir una partícula del vector retroviral pseudogenotipado, que comprende:

(i) una primera molécula de ácido nucleico que codifica una glicoproteína E2 del virus Sindbis de la SEQ ID N°: 1 en la que 160X no está o un aminoácido distinto del ácido glutámico, o su variante capaz de infectar células dendríticas

con al menos una secuencia con el 80% de identidad respecto a SEQ ID N°: 1, y;

(ii) una segunda molécula de ácido nucleico en la que la segunda molécula de ácido nucleico puede transcribirse y la transcripción se puede ensamblar en una partícula del vector retroviral pseudogenotipada.

12. El sistema de empaquetamiento de la realización 11, en el que la glicoproteína E2 tiene una secuencia de aminoácidos como se define en una cualquiera de las realizaciones 1 a 9 anteriores.

13. El sistema de empaquetamiento de la realización 11 ó 12, en el que la primera molécula de ácido nucleico codifica una glicoproteína E3/E2, opcionalmente en la forma de una poliproteína E3/E2/6K/E1 del virus Sindbis.

14. El sistema de empaquetado de la realización 13, en el que la secuencia E3 corresponde a los residuos 1-65 de la SEQ ID N°: 20, o su variante con, al menos, un 80% de identidad de secuencia con los residuos 1-65 de la SEQ ID N°: 20, en la que los residuos 62-65 son RSKR (SEQ ID NO: 27) y la variante es capaz de ser incorporada en una envoltura vírica pseudogenotipada, opcionalmente, además, en la que el residuo 1 de la poliproteína E2 es Ser.

15. El sistema de empaquetamiento de la realización 11, 12, 13 ó 14, que comprende además una tercera molécula de ácido nucleico que codifica las proteínas gag y pol.

16. El sistema de empaquetamiento de una cualquiera de las realizaciones 11 a 15, en el que la segunda molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de interés.

17. Una célula transfectada con la primera y segunda moléculas de ácido nucleico de una cualquiera de las realizaciones 11 a 16.

18. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína de cualquiera de las realizaciones 1 a 9, o la glicoproteína E3/E2 definida en las realizaciones 13 ó 14.

19. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la realización 18.

20. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la realización 19.

21. Un método para fabricar una partícula vectorial retroviral de una cualquiera de las realizaciones 1 a 10, que comprende expresar en una célula:

(i) una primera molécula de ácido nucleico que codifica una glicoproteína E2 del virus Sindbis de la SEQ ID N°: 1 en la que 160X es diferente del ácido glutámico, o su variante, que puede infectar células dendríticas con al menos una identidad del 80% respecto a la SEQ ID N°: 1, y;

(ii) una segunda molécula de ácido nucleico en la que la segunda molécula de ácido nucleico puede transcribirse y la transcripción se puede ensamblar en una partícula del vector retroviral pseudogenotipado.

22. Una partícula vectorial retroviral de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 10 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto humano o animal.

23. Un método para suministrar partículas vectoriales retroviral a células in vitro, que comprende mezclar las células con las partículas vectoriales retrovirales de una cualquiera de las realizaciones 1 a 10.

24. Una vacuna terapéutica que comprende las partículas vectoriales retrovirales de una cualquiera de las realizaciones 1 a 10 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Immune Design Corporation

5 <120> Vectores lentivirales pseudogenotipados con una envoltura de glucoproteína del virus Sindbis

<130> AHB/FP6943534

<140> EP

10 <141> 22-07-2010

<150> EP 10737715.2

<151> 22-07-2010

15 <150> US 61/228491

<151> 24-07-2009

<160> 27

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 423

<212> PRT

25 <213> Virus Sindbis

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (160)..(160)

30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 1

Ser	Val	Ile	Asp	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ser	Pro	Tyr	Leu	Gly	Thr	Cys
1				5					10					15	
Ser	Tyr	Cys	His	His	Thr	Val	Pro	Cys	Phe	Ser	Pro	Val	Lys	Ile	Glu
			20					25					30		
Gln	Val	Trp	Asp	Glu	Ala	Asp	Asp	Asn	Thr	Ile	Arg	Ile	Gln	Thr	Ser
		35					40					45			
Ala	Gln	Phe	Gly	Tyr	Asp	Gln	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys	Tyr
	50					55					60				
Arg	Tyr	Met	Ser	Leu	Lys	Gln	Asp	His	Thr	Val	Lys	Glu	Gly	Thr	Met
65					70					75					80
Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser	Tyr
				85					90					95	
Lys	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Val	Thr
			100					105					110		

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

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

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

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
420

<210> 2

<211> 986

<212> PRT

<213> Virus Sindbis

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

660	665	670
Thr Ala Ala Met Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr 675 680 685		
Ser Phe Leu Asp Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys 690 695 700		
Asp Leu Lys Val Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe 705 710 715 720		
Asp His Lys Val Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe 725 730 735		
Pro Glu Tyr Gly Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala 740 745 750		
Thr Ser Leu Thr Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu 755 760 765		
Leu Lys Pro Ser Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser 770 775 780		
Ser Gly Phe Glu Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu 785 790 795 800		
Thr Ala Pro Phe Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val 805 810 815		
Asp Cys Ser Tyr Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala 820 825 830		
Ala Phe Ile Arg Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys 835 840 845		
Glu Val Ser Glu Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr 850 855 860		
Leu Gln Tyr Val Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His 865 870 875 880		
Ser Ser Thr Ala Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys 885 890 895		
Gly Ala Val Thr Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe 900 905 910		

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

<210> 3
<211> 982
<212> PRT
<213> Virus Sindbis

<400> 3
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
 660 665 670
 Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
 675 680 685
 Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
 690 695 700
 Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
 705 710 715 720
 Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
 725 730 735
 Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
 740 745 750
 Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
 755 760 765
 Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
 770 775 780
 Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
 785 790 795 800
 Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
 805 810 815
 Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
 820 825 830
 Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
 835 840 845
 Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
 850 855 860
 Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
 865 870 875 880
 Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
 885 890 895
 Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu

ES 2 702 274 T3

900 905 910
 Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
 915 920 925
 His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
 930 935 940
 Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
 945 950 955 960
 Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
 965 970 975
 Leu Thr Ser Thr Arg Arg
 980
 <210> 4
 <211> 982
 <212> PRT
 <213> Virus Sindbis
 <400> 4
 Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
 1 5 10 15
 Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
 20 25 30
 Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
 35 40 45
 Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
 50 55 60
 Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
 65 70 75 80
 Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
 85 90 95
 Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
 100 105 110
 Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
 115 120 125
 Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

Thr Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro
 385 390 395 400
 Val Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp
 405 410 415
 Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr
 420 425 430
 Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr
 435 440 445
 Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro
 450 455 460
 Tyr Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu
 465 470 475 480
 Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser
 485 490 495
 Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile
 500 505 510
 Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu
 515 520 525
 Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp Ala Tyr
 530 535 540
 Glu His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala
 545 550 555 560
 Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
 565 570 575
 Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
 580 585 590
 Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
 595 600 605
 Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
 610 615 620
 Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
 625 630 635 640

ES 2 702 274 T3

Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
 645 650 655
 Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
 660 665 670
 Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
 675 680 685
 Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
 690 695 700
 Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
 705 710 715 720
 Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
 725 730 735
 Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
 740 745 750
 Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
 755 760 765
 Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
 770 775 780
 Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
 785 790 795 800
 Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr
 805 810 815
 Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
 820 825 830
 Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
 835 840 845
 Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
 850 855 860
 Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
 865 870 875 880
 Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
 885 890 895

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

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

<400> 5
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser Glu
 625 630 635 640
 Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys Ala
 645 650 655
 Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys Val
 660 665 670
 Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val Tyr
 675 680 685
 Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile Ala
 690 695 700
 Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val Ile
 705 710 715 720
 His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala Met
 725 730 735
 Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser Lys
 740 745 750
 Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala Lys
 755 760 765
 Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met Trp
 770 775 780
 Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly Cys
 785 790 795 800
 Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly Asn
 805 810 815
 Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg Thr Ser
 820 825 830
 Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu Cys Thr
 835 840 845
 Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser Asp
 850 855 860
 Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala Thr Leu
 865 870 875 880

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

Ser Thr Arg Arg
980

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

<400> 6
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Thr Arg Arg
980

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

<400> 7
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

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

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

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

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

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

ES 2 702 274 T3

Glu	Gln	Val	Trp	Asp	Glu	Ala	Asp	Asp	Asn	Thr	Ile	Arg	Ile	Gln	Thr		
			100					105					110				
Ser	Ala	Gln	Phe	Gly	Tyr	Asp	Gln	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys		
		115					120						125				
Tyr	Arg	Tyr	Met	Ser	Leu	Lys	Gln	Asp	His	Thr	Val	Lys	Glu	Gly	Thr		
	130					135					140						
Met	Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser		
145					150					155					160		
Tyr	Lys	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Val		
				165					170						175		
Thr	Val	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Cys	Thr	Leu	Ala		
			180					185						190			
Arg	Lys	Ile	Lys	Pro	Lys	Phe	Val	Gly	Arg	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu	Pro		
		195					200						205				
Pro	Val	His	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Asp	Arg	Leu	Glu		
	210					215						220					
Gly	Thr	Thr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Thr	Met	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Ala		
225					230					235					240		
Tyr	Thr	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Tyr	Ala	Lys	Pro		
				245					250					255			
Pro	Ser	Gly	Lys	Asn	Ile	Thr	Tyr	Glu	Cys	Lys	Cys	Gly	Asp	Tyr	Lys		
			260					265					270				
Thr	Gly	Thr	Val	Ser	Thr	Arg	Thr	Glu	Ile	Thr	Gly	Cys	Thr	Ala	Ile		
		275					280					285					
Lys	Gln	Cys	Val	Ala	Tyr	Lys	Ser	Asp	Gln	Thr	Lys	Trp	Val	Phe	Asn		
	290					295						300					
Ser	Pro	Asp	Leu	Ile	Arg	His	Asp	Asp	His	Thr	Ala	Gln	Gly	Lys	Leu		
305					310					315					320		
His	Leu	Pro	Phe	Lys	Leu	Ile	Pro	Ser	Thr	Cys	Met	Val	Pro	Val	Ala		
				325					330					335			
His	Ala	Pro	Asn	Val	Ile	His	Gly	Phe	Lys	His	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu		
			340					345					350				

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

850

855

860

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 8

<211> 981

<212> PRT

<213> Virus Sindbis

<400> 8

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

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

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

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

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

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile

5

ES 2 702 274 T3

					85						90					95
Glu	Gln	Val	Trp	Asp	Glu	Ala	Asp	Asp	Asn	Thr	Ile	Arg	Ile	Gln	Thr	
			100						105					110		
Ser	Ala	Gln	Phe	Gly	Tyr	Asp	Gln	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys	
		115					120						125			
Tyr	Arg	Tyr	Met	Ser	Leu	Lys	Gln	Asp	His	Thr	Val	Lys	Glu	Gly	Thr	
	130					135					140					
Met	Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser	
145					150					155					160	
Tyr	Lys	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Val	
				165					170					175		
Thr	Val	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Cys	Thr	Leu	Ala	
			180					185					190			
Arg	Lys	Ile	Lys	Pro	Lys	Phe	Val	Gly	Arg	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu	Pro	
		195					200						205			
Pro	Val	His	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Asp	Arg	Leu	Glu	
	210					215					220					
Thr	Thr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Thr	Met	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Ala	Tyr	
225					230					235					240	
Thr	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Tyr	Ala	Lys	Pro	Pro	
			245						250					255		
Ser	Gly	Lys	Asn	Ile	Thr	Tyr	Glu	Cys	Lys	Cys	Gly	Asp	Tyr	Lys	Thr	
			260					265					270			
Gly	Thr	Val	Ser	Thr	Arg	Thr	Glu	Ile	Thr	Gly	Cys	Thr	Ala	Ile	Lys	
		275					280					285				
Gln	Cys	Val	Ala	Tyr	Lys	Ser	Asp	Gln	Thr	Lys	Trp	Val	Phe	Asn	Ser	
	290					295					300					
Pro	Asp	Leu	Ile	Arg	His	Asp	Asp	His	Thr	Ala	Gln	Gly	Lys	Leu	His	
305					310					315					320	
Leu	Pro	Phe	Lys	Leu	Ile	Pro	Ser	Thr	Cys	Met	Val	Pro	Val	Ala	His	
				325					330					335		

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 9

<211> 982

<212> PRT

<213> Virus Sindbis

<400> 9

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

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

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

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

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

ES 2 702 274 T3

Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
 85 90 95
 Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
 100 105 110
 Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
 115 120 125
 Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Glu Glu Gly Thr
 130 135 140
 Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
 145 150 155 160
 Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190
 Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
 195 200 205
 Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Glu
 210 215 220
 Gly Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala
 225 230 235 240
 Tyr Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro
 245 250 255
 Pro Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly Cys Thr Ala Ile
 275 280 285
 Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn
 290 295 300
 Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu
 305 310 315 320
 His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala

ES 2 702 274 T3

				325				330				335			
His	Ala	Pro	Asn	Val	Ile	His	Gly	Phe	Lys	His	Ile	Ser	Leu	Gln	Leu
			340				345						350		
Asp	Thr	Asp	His	Leu	Thr	Leu	Leu	Thr	Thr	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Asn
		355				360						365			
Pro	Glu	Pro	Thr	Thr	Glu	Trp	Ile	Val	Gly	Lys	Thr	Val	Arg	Asn	Phe
		370				375				380					
Thr	Val	Asp	Arg	Asp	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Trp	Gly	Asn	His	Glu	Pro
385				390						395					400
Val	Arg	Val	Tyr	Ala	Gln	Glu	Ser	Ala	Pro	Gly	Asp	Pro	His	Gly	Trp
			405				410						415		
Pro	His	Glu	Ile	Val	Gln	His	Tyr	Tyr	His	Arg	His	Pro	Val	Tyr	Thr
			420				425						430		
Ile	Leu	Ala	Val	Ala	Ser	Ala	Thr	Val	Ala	Met	Met	Ile	Gly	Val	Thr
		435				440						445			
Val	Ala	Val	Leu	Cys	Ala	Cys	Lys	Ala	Arg	Arg	Glu	Cys	Leu	Thr	Pro
		450				455			460						
Tyr	Ala	Leu	Ala	Pro	Asn	Ala	Val	Ile	Pro	Thr	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu
465				470						475			480		
Cys	Cys	Val	Arg	Ser	Ala	Asn	Ala	Glu	Thr	Phe	Thr	Glu	Thr	Met	Ser
			485				490						495		
Tyr	Leu	Trp	Ser	Asn	Ser	Gln	Pro	Phe	Phe	Trp	Val	Gln	Leu	Cys	Ile
			500				505						510		
Pro	Leu	Ala	Ala	Phe	Ile	Val	Leu	Met	Arg	Cys	Cys	Ser	Cys	Cys	Leu
		515				520						525			
Pro	Phe	Leu	Val	Val	Ala	Gly	Ala	Tyr	Leu	Ala	Lys	Val	Asp	Ala	Tyr
		530				535				540					
Glu	His	Ala	Thr	Thr	Val	Pro	Asn	Val	Pro	Gln	Ile	Pro	Tyr	Lys	Ala
545				550						555			560		
Leu	Val	Glu	Arg	Ala	Gly	Tyr	Ala	Pro	Leu	Asn	Leu	Glu	Ile	Thr	Val
			565				570						575		

ES 2 702 274 T3

Met	Ser	Ser	Glu	Val	Leu	Pro	Ser	Thr	Asn	Gln	Glu	Tyr	Ile	Thr	Cys	580	585	590
Lys	Phe	Thr	Thr	Val	Val	Pro	Ser	Pro	Lys	Ile	Lys	Cys	Cys	Gly	Ser	595	600	605
Leu	Glu	Cys	Gln	Pro	Ala	Ala	His	Ala	Asp	Tyr	Thr	Cys	Lys	Val	Phe	610	615	620
Gly	Gly	Val	Tyr	Pro	Phe	Met	Trp	Gly	Gly	Ala	Gln	Cys	Phe	Cys	Asp	625	630	635
Ser	Glu	Asn	Ser	Gln	Met	Ser	Glu	Ala	Tyr	Val	Glu	Leu	Ser	Ala	Asp	645	650	655
Cys	Ala	Ser	Asp	His	Ala	Gln	Ala	Ile	Lys	Val	His	Thr	Ala	Ala	Met	660	665	670
Lys	Val	Gly	Leu	Arg	Ile	Val	Tyr	Gly	Asn	Thr	Thr	Ser	Phe	Leu	Asp	675	680	685
Val	Tyr	Val	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Lys	Asp	Leu	Lys	Val	690	695	700
Ile	Ala	Gly	Pro	Ile	Ser	Ala	Ser	Phe	Thr	Pro	Phe	Asp	His	Lys	Val	705	710	715
Val	Ile	His	Arg	Gly	Leu	Val	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Phe	Pro	Glu	Tyr	Gly	725	730	735
Ala	Met	Lys	Pro	Gly	Ala	Phe	Gly	Asp	Ile	Gln	Ala	Thr	Ser	Leu	Thr	740	745	750
Ser	Lys	Asp	Leu	Ile	Ala	Ser	Thr	Asp	Ile	Arg	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	755	760	765
Ala	Lys	Asn	Val	His	Val	Pro	Tyr	Thr	Gln	Ala	Ser	Ser	Gly	Phe	Glu	770	775	780
Met	Trp	Lys	Asn	Asn	Ser	Gly	Arg	Pro	Leu	Gln	Glu	Thr	Ala	Pro	Phe	785	790	795
Gly	Cys	Lys	Ile	Ala	Val	Asn	Pro	Leu	Arg	Ala	Val	Asp	Cys	Ser	Tyr	805	810	815
Gly	Asn	Ile	Pro	Ile	Ser	Ile	Asp	Ile	Pro	Asn	Ala	Ala	Phe	Ile	Arg	820	825	830

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

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

<400> 10
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

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

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

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

ES 2 702 274 T3

Arg	Ser	Val	Ile	Asp	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ser	Pro	Tyr	Leu	Gly	Thr	65	70	75	80
Cys	Ser	Tyr	Cys	His	His	Thr	Val	Pro	Cys	Phe	Ser	Pro	Val	Lys	Ile	85	90	95	
Glu	Gln	Val	Trp	Asp	Glu	Ala	Asp	Asp	Asn	Thr	Ile	Arg	Ile	Gln	Thr	100	105	110	
Ser	Ala	Gln	Phe	Gly	Tyr	Asp	Gln	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Asn	Lys	115	120	125	
Tyr	Arg	Tyr	Met	Ser	Leu	Lys	Gln	Asp	His	Thr	Val	Glu	Glu	Gly	Thr	130	135	140	
Met	Asp	Asp	Ile	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	Gly	Pro	Cys	Arg	Arg	Leu	Ser	145	150	155	160
Tyr	Lys	Gly	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Val	165	170	175	
Thr	Val	Ser	Ile	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Thr	Ser	Cys	Thr	Leu	Ala	180	185	190	
Arg	Lys	Ile	Lys	Pro	Lys	Phe	Val	Gly	Arg	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu	Pro	195	200	205	
Pro	Val	His	Gly	Lys	Lys	Ile	Pro	Cys	Thr	Val	Tyr	Asp	Arg	Leu	Glu	210	215	220	
Thr	Thr	Ala	Gly	Tyr	Ile	Thr	Met	His	Arg	Pro	Arg	Pro	His	Ala	Tyr	225	230	235	240
Thr	Ser	Tyr	Leu	Glu	Glu	Ser	Ser	Gly	Lys	Val	Tyr	Ala	Lys	Pro	Pro	245	250	255	
Ser	Gly	Lys	Asn	Ile	Thr	Tyr	Glu	Cys	Lys	Cys	Gly	Asp	Tyr	Lys	Thr	260	265	270	
Gly	Thr	Val	Ser	Thr	Arg	Thr	Glu	Ile	Thr	Gly	Cys	Thr	Ala	Ile	Lys	275	280	285	
Gln	Cys	Val	Ala	Tyr	Lys	Ser	Asp	Gln	Thr	Lys	Trp	Val	Phe	Asn	Ser	290	295	300	
Pro	Asp	Leu	Ile	Arg	His	Asp	Asp	His	Thr	Ala	Gln	Gly	Lys	Leu	His	305	310	315	320

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

565	570	575
Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys 580 585 590		
Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu 595 600 605		
Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly 610 615 620		
Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser 625 630 635 640		
Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys 645 650 655		
Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys 660 665 670		
Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val 675 680 685		
Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile 690 695 700		
Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val 705 710 715 720		
Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala 725 730 735		
Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser 740 745 750		
Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala 755 760 765		
Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met 770 775 780		
Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly 785 790 795 800		
Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr Gly 805 810 815		

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Thr Arg Arg
980

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

<400> 11
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

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

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

Leu Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val
 565 570 575
 Met Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys
 580 585 590
 Lys Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser
 595 600 605
 Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe
 610 615 620
 Gly Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp
 625 630 635 640
 Ser Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp
 645 650 655
 Cys Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met
 660 665 670
 Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp
 675 680 685
 Val Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val
 690 695 700
 Ile Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val
 705 710 715 720
 Val Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly
 725 730 735
 Ala Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr
 740 745 750
 Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser
 755 760 765
 Ala Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu
 770 775 780
 Met Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe
 785 790 795 800
 Gly Cys Lys Ile Ala Val Asn Pro Leu Arg Ala Val Asp Cys Ser Tyr

ES 2 702 274 T3

805 810 815
 Gly Asn Ile Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Asn Ala Ala Phe Ile Arg
 820 825 830
 Thr Ser Asp Ala Pro Leu Val Ser Thr Val Lys Cys Glu Val Ser Glu
 835 840 845
 Cys Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val
 850 855 860
 Ser Asp Arg Glu Gly Gln Cys Pro Val His Ser His Ser Ser Thr Ala
 865 870 875 880
 Thr Leu Gln Glu Ser Thr Val His Val Leu Glu Lys Gly Ala Val Thr
 885 890 895
 Val His Phe Ser Thr Ala Ser Pro Gln Ala Asn Phe Ile Val Ser Leu
 900 905 910
 Cys Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp
 915 920 925
 His Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala
 930 935 940
 Ile Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala
 945 950 955 960
 Ser Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met
 965 970 975
 Leu Thr Ser Thr Arg Arg
 980
 <210> 12
 <211> 981
 <212> PRT
 <213> Virus Sindbis
 <400> 12
 Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
 1 5 10 15
 Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
 20 25 30
 Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

His Ala Thr Thr Val Pro Asn Val Pro Gln Ile Pro Tyr Lys Ala Leu
 545 550 555 560
 Val Glu Arg Ala Gly Tyr Ala Pro Leu Asn Leu Glu Ile Thr Val Met
 565 570 575
 Ser Ser Glu Val Leu Pro Ser Thr Asn Gln Glu Tyr Ile Thr Cys Lys
 580 585 590
 Phe Thr Thr Val Val Pro Ser Pro Lys Ile Lys Cys Cys Gly Ser Leu
 595 600 605
 Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Asp Tyr Thr Cys Lys Val Phe Gly
 610 615 620
 Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Gln Cys Phe Cys Asp Ser
 625 630 635 640
 Glu Asn Ser Gln Met Ser Glu Ala Tyr Val Glu Leu Ser Ala Asp Cys
 645 650 655
 Ala Ser Asp His Ala Gln Ala Ile Lys Val His Thr Ala Ala Met Lys
 660 665 670
 Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr Ser Phe Leu Asp Val
 675 680 685
 Tyr Val Asn Gly Val Thr Pro Gly Thr Ser Lys Asp Leu Lys Val Ile
 690 695 700
 Ala Gly Pro Ile Ser Ala Ser Phe Thr Pro Phe Asp His Lys Val Val
 705 710 715 720
 Ile His Arg Gly Leu Val Tyr Asn Tyr Asp Phe Pro Glu Tyr Gly Ala
 725 730 735
 Met Lys Pro Gly Ala Phe Gly Asp Ile Gln Ala Thr Ser Leu Thr Ser
 740 745 750
 Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser Ala
 755 760 765
 Lys Asn Val His Val Pro Tyr Thr Gln Ala Ser Ser Gly Phe Glu Met
 770 775 780
 Trp Lys Asn Asn Ser Gly Arg Pro Leu Gln Glu Thr Ala Pro Phe Gly
 785 790 795 800

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Thr Arg Arg
980

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

<400> 13
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 14

<211> 981

<212> PRT

<213> Virus Sindbis

<400> 14

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

ES 2 702 274 T3

Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
 20 25 30
 Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
 35 40 45
 Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
 50 55 60
 Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
 65 70 75 80
 Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
 85 90 95
 Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
 100 105 110
 Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
 115 120 125
 Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Glu Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr
 130 135 140
 Met Asp Asp Ile Lys Ile Ser Thr Ser Gly Pro Cys Arg Arg Leu Ser
 145 150 155 160
 Tyr Lys Gly Tyr Phe Leu Leu Ala Lys Cys Pro Pro Gly Asp Ser Val
 165 170 175
 Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala
 180 185 190
 Arg Lys Ile Lys Pro Lys Phe Val Gly Arg Glu Lys Tyr Asp Leu Pro
 195 200 205
 Pro Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys
 210 215 220
 Thr Thr Ala Gly Tyr Ile Thr Met His Arg Pro Arg Pro His Ala Tyr
 225 230 235 240
 Thr Ser Tyr Leu Glu Glu Ser Ser Gly Lys Val Tyr Ala Lys Pro Pro
 245 250 255
 Ser Gly Lys Asn Ile Thr Tyr Glu Cys Lys Cys Gly Asp Tyr Lys Thr
 260 265 270

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Thr Arg Arg
980

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

<400> 15

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Lys Asp Leu Ile Ala Ser Thr Asp Ile Arg Leu Leu Lys Pro Ser

ES 2 702 274 T3

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

<210> 16
 <211> 981
 <212> PRT
 <213> Virus Sindbis
 <400> 16

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Thr Arg Arg
980

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 18
<211> 423
<212> PRT
<213> Virus Sindbis

<400> 18

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
420

<210> 19

<211> 65

<212> PRT

<213> Virus Sindbis

<400> 19

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

ES 2 702 274 T3

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

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

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

Arg
65

<210> 20
<211> 488
<212> PRT
<213> Virus Sindbis

<400> 20
Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 702 274 T3

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

ES 2 702 274 T3

405

410

415

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

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

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

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

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
485

<210> 21

<211> 683

<212> ADN

<213> Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 21

cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60

ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120

aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaaag aaaagggggg 180

actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatatc cttgatctgt ggatctacca 240

cacacaaggc tacttccttg attggcagaa ctacacacca gggccaggga tcagatatcc 300

actgaccttt ggatggtgct acaagctagt accagttgag caagagaagg tagaagaagc 360

caatgaagga gagaacaccc gcttggttaca ccctgtgagc ctgcatggga tggatgaccc 420

ggagagagaa gtattagagt ggaggtttga cagccgccta gcatttcacac acatggcccg 480

agagctgcat ccggactgta ctgggtctct ctgggttagac cagatctgag cctgggagct 540

ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgccctt gagtgccttca 600

agtagtgtgt gcccgtctgt tgtgtgactc tggtaactag agatccctca gaccctttta 660

gtcagtggtg aaaatctcta gca 683

<210> 22

<211> 416

<212> ADN

<213> Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 22

cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60

ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120

	aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaaag aaaagggggg	180
	actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatctg ctttttgcct gtactgggtc	240
	tctctgggta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct	300
	taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgtc tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga	360
	ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagca	416
5	<210> 23 <211> 401 <212> ADN <213> Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1	
	<400> 23 cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc	60
	ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt	120
	aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttactgg aagggtctaat	180
	tcactcccaa cgaagacaag atctgctttt tgcctgtact gggctctctc ggtagacca	240
	gatctgagcc tgggagctct ctggctaact aggaaccca ctgcttaagc ctcaataaag	300
	cttgccctga gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag	360
10	atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa aatctctagc a	401
	<210> 24 <211> 8 <212> PRT <213> Gallus gallus	
15	<400> 24 Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu 1 5	
20	<210> 25 <211> 9 <212> PRT <213> Mus musculus	
25	<400> 25 Ser Pro Ser Tyr Ala Tyr His Gln Phe 1 5	
30	<210> 26 <211> 5 <212> PRT <213> Virus Sindbis	
35	<400> 26 Arg Ser Lys Arg Ser 1 5	
40	<210> 27 <211> 4 <212> PRT <213> Virus Sindbis	
	<400> 27 Arg Ser Lys Arg 1	

REIVINDICACIONES

1. Una partícula del vector lentiviral pseudogenotipado que comprende una envoltura que comprende una glicoproteína de un Arbovirus, en la que la partícula comprende:

(a) una integrasa no funcional, y

5 (b) un genoma del vector lentiviral que comprende una mutación o eliminación del tracto de polipurina proximal 3' LTR (PPT) que hace que el PPT no sea funcional.

2. La partícula del vector lentiviral pseudogenotipado de la reivindicación 1, en la que dicha glicoproteína de la envoltura es de un virus Sindbis, un virus Dengue o un virus de la encefalitis equina venezolana.

3. La partícula del vector lentiviral pseudogenotipado de la reivindicación 1 ó 2, en la que:

10 (a) la integrasa no funcional comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en D64E, D64V, D116N, N120K, Q148A, W235E, K264R, K266R, K273R y sus combinaciones, y

(b) el tracto de polipurina proximal 3' LTR comprende (i) una eliminación del tracto de polipurina que hace que el PPT no sea funcional o (ii) una o más mutaciones en la mitad 5' del tracto de polipurina que hace que el PPT no sea funcional y/o (iii) una mutación en el extremo 3' del tracto de la polipurina que hace que el PPT no sea funcional.

15 4. La partícula del vector lentiviral pseudogenotipada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la integrasa tiene una mutación D64V y se elimina el PPT.

5. La partícula del vector lentiviral pseudogenotipado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el genoma del vector lentiviral comprende al menos uno de los siguientes:

(a) una secuencia de la LTR 5', opcionalmente la secuencia R y/o la secuencia U5,

20 (b) una LTR 3' inactivada o autoinactivada, que comprende, opcionalmente, una eliminación de la secuencia potenciadora y/o la secuencia promotora,

(c) una secuencia 3' LTR U3 que comprende una eliminación de la secuencia potenciadora, caja TATA, sitios Sp1 y NF-kappa B, y

25 (d) una secuencia 5' LTR U3 que comprende una secuencia promotora heteróloga, opcionalmente en combinación con una secuencia potenciadora, y

(e) uno o más elementos genéticos seleccionados del grupo que consiste en una secuencia supresora ámbar de ARNt, una secuencia aislante de globulina beta de pollo y un elemento sensible al virus de la hepatitis de la marmota.

30 6. La partícula del vector lentiviral pseudogenotipado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el genoma del vector lentiviral se selecciona del grupo que consiste en el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1), VIH-2, virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), virus de la anemia infecciosa equina, virus de la inmunodeficiencia del Simio (SIV) y virus maedi/visna.

7. La partícula vectorial lentiviral de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el genoma del vector lentiviral comprende la secuencia de interés que expresa un producto que es un antígeno de un agente causante de enfermedad o una célula enferma.

35 8. La partícula vectorial lentiviral de la reivindicación 7, en la que la secuencia de interés codifica un antígeno específico del tumor, opcionalmente NY-ESO-1, MAGE, MART-1/Melan-A, BAGE, RAGE, un antígeno del linaje de melanocito-melanoma, tal como gp100, gp75, mda-7, tirosinasa o proteína relacionada con tirosinasa; antígeno del carcinoma de células renales, 5T4, SM22-alfa, anhidrasa carbónica I, anhidrasa carbónica IX (también conocida como G250), factores inducibles por hipoxia (opcionalmente, HIF-1 alfa o HIF-2alfa), VEGF o antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), antígeno específico de la próstata (PSA), fosfatos ácidos prostáticos, antígeno epitelial de seis dominios transmembrana de la próstata (STEAP), NKX3.1, proteínas/péptidos de epítomos derivados de genes mutados en células tumorales o genes transcritos a diferentes niveles en el tumor comparado con células normales, tales como la enzima telomerasa, survivina, mesotelina, ras mutado, reorganización de bcr/abl, Her2/neu, p53 mutado o natural, citocromo P450 1B1, secuencias de intrones expresadas anormalmente tales como N-acetilglucosaminiltransferasa-V; reordenaciones clónicas de genes de inmunoglobulina que generan idiotipos únicos en el mieloma o linfomas de células B; proteínas/péptidos de epítomos derivados de procedimientos oncovíricos, tales como las proteínas del virus del papiloma humano E6 o E7 o proteínas oncofetales no mutadas con una expresión selectiva del tumor, tal como el antígeno carcinoembrionario o alfa-fetoproteína, un antígeno derivado de virus, como un antígeno de VIH o SIV, polipéptido de adenovirus, polipéptidos de alfavirus, polipéptidos de calicivirus, por ejemplo, un antígeno de cápside de calicivirus, polipéptidos de coronavirus, polipéptido de virus del moquillo, polipéptido del virus del Ébola, polipéptido del enterovirus, polipéptido del flavivirus, polipéptido del virus de la hepatitis (AE), por ejemplo, un antígeno de superficie o núcleo de la hepatitis B, o glicoproteínas E1 o E2 del virus de la hepatitis C,

40

45

50

- proteínas del núcleo o no estructurales, polipéptido del virus del herpes, por ejemplo, una glicoproteína del virus del herpes simple o virus de la varicela zoster, polipéptido del virus de la inmunodeficiencia, por ejemplo, la envoltura o proteasa del virus de la inmunodeficiencia humana, polipéptido del virus de la peritonitis infecciosa, polipéptido del virus de la gripe, por ejemplo, una hemaglutinina de influenza A, neuraminidasa; o nucleoproteína, polipéptido del virus de la leucemia, polipéptido del virus de Marburg, polipéptido del ortomixovirus, polipéptido del virus del papiloma, polipéptido del virus de la parainfluenza, por ejemplo, la hemaglutinina/neuraminidasa, polipéptido del paramixovirus, polipéptido del parvovirus, polipéptido del pestivirus, polipéptido del virus del picoma, por ejemplo, un polipéptido de virus de la polio, polipéptido del virus de la viruela, por ejemplo, un polipéptido del virus vaccinia, polipéptido del virus de la rabia, por ejemplo, una glicoproteína G del virus de la rabia, polipéptido de reovirus, polipéptido del retrovirus o polipéptido del rotavirus
9. Una composición que comprende una partícula vectorial lentiviral según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la composición tiene una UI de al menos 10^5 /ml.
10. Un sistema de empaquetamiento de vector lentiviral para producir una partícula de vector lentiviral pseudogenotipado no integrante de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende una célula de empaquetamiento que comprende (a) un ácido nucleico que codifica una integrasa no funcional; (b) un genoma de vector lentiviral que comprende una mutación o eliminación del tracto de polipurina proximal 3' LTR (PPT) que hace que el PPT no sea funcional; y (c) un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica una glicoproteína de envoltura de un Arbovirus.
11. El sistema de empaquetamiento del vector lentiviral de la reivindicación 10, en el que:
- (a) el ácido nucleico que codifica la integrasa no funcional comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en D64E, D64V, D I 16N, N120K, Q148A, W235E, K264R, K266R, K273R, y sus combinaciones, y
- (b) el tracto de polipurina proximal 3' LTR comprende (i) una eliminación del tracto de polipurina que hace que el PPT no sea funcional o (ii) una o más mutaciones en la mitad 5' del tracto de polipurina que hace que el PPT no sea funcional y/o (iii) una mutación en el extremo 3' del tracto de la polipurina que hace que el PPT no sea funcional.
12. El sistema de empaquetamiento del vector lentiviral de la reivindicación 10 u 11, en el que el ácido nucleico que codifica la integrasa no funcional comprende una mutación D64V y el genoma del vector lentiviral comprende una eliminación del tracto de polipurina proximal 3' LTR (PPT).
13. Un método para preparar una partícula vectorial lentiviral pseudogenotipada de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o la composición de la reivindicación 9, que comprende cultivar la célula de empaquetamiento de la reivindicación 10.
14. Una partícula vectorial lentiviral pseudogenotipada de cualquiera de las reivindicaciones 7 u -8, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano o animal.
15. Una partícula vectorial lentiviral para su uso de acuerdo con la reivindicación 14 para la inducción de una respuesta inmunitaria específica del antígeno, opcionalmente una respuesta humoral y/o respuesta celular o para tratar tumores.
16. Una vacuna terapéutica o profiláctica que comprende las partículas vectoriales lentivirales pseudogenotipadas de cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

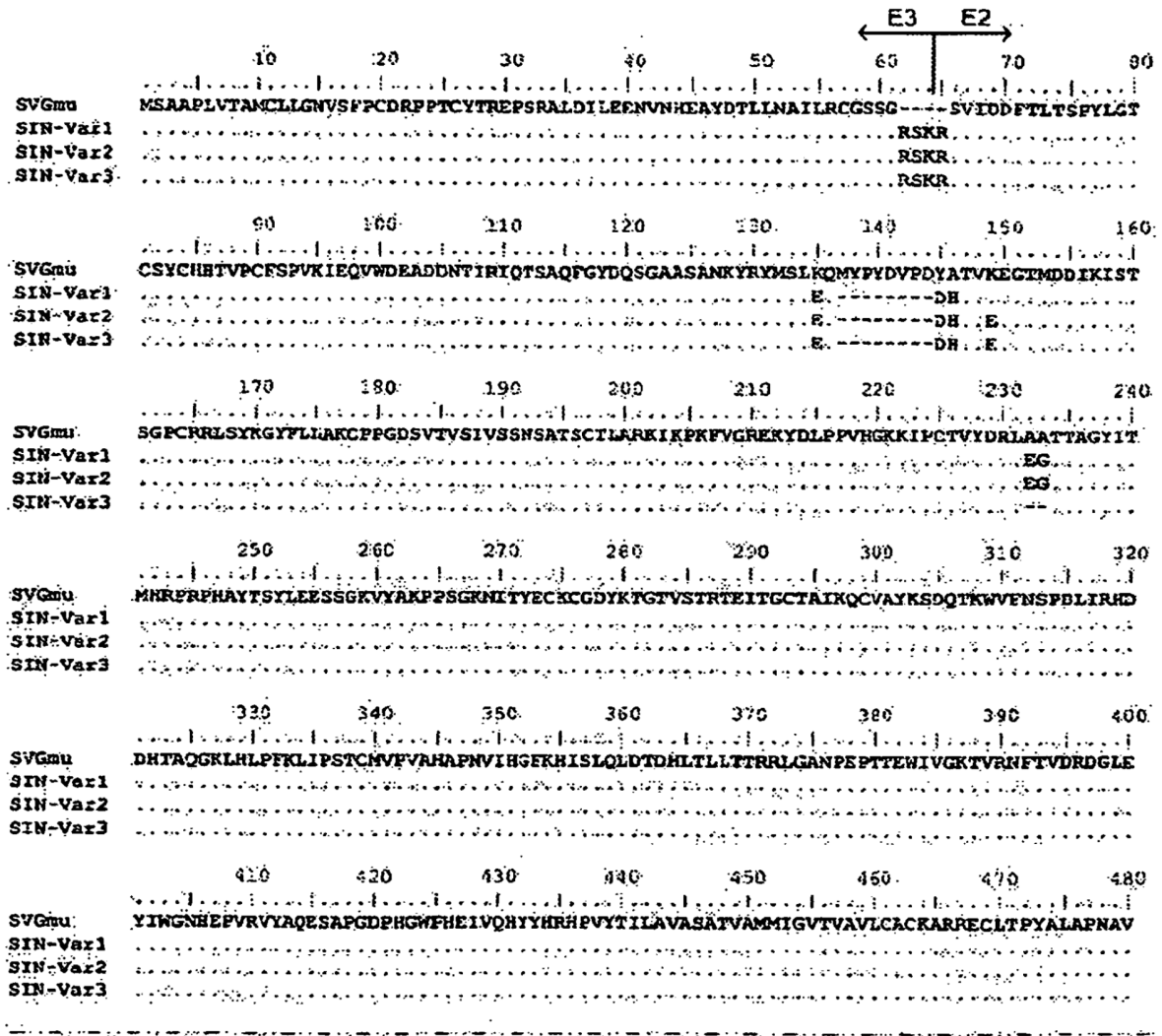


FIGURA 1A

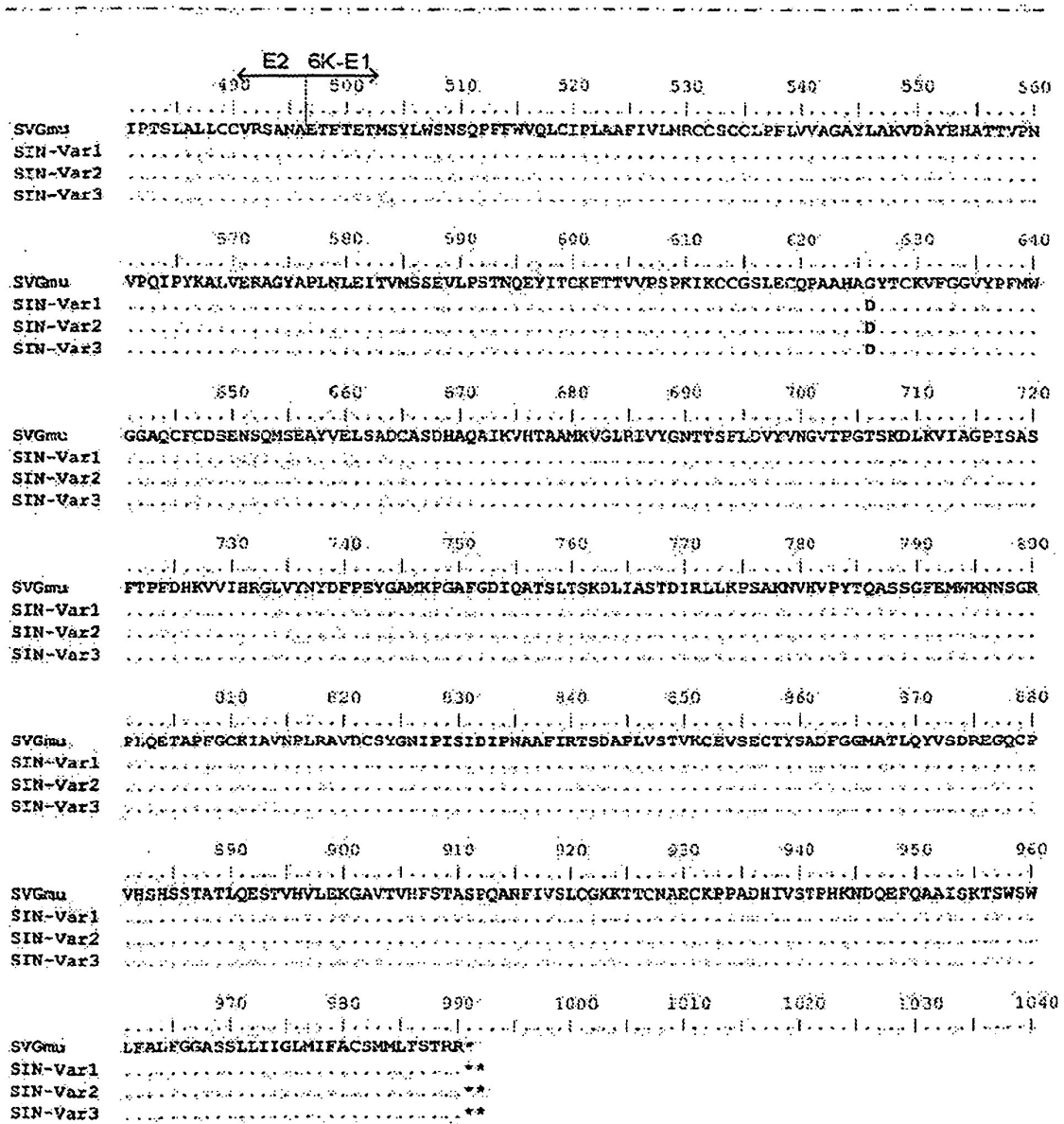


FIGURA 1B

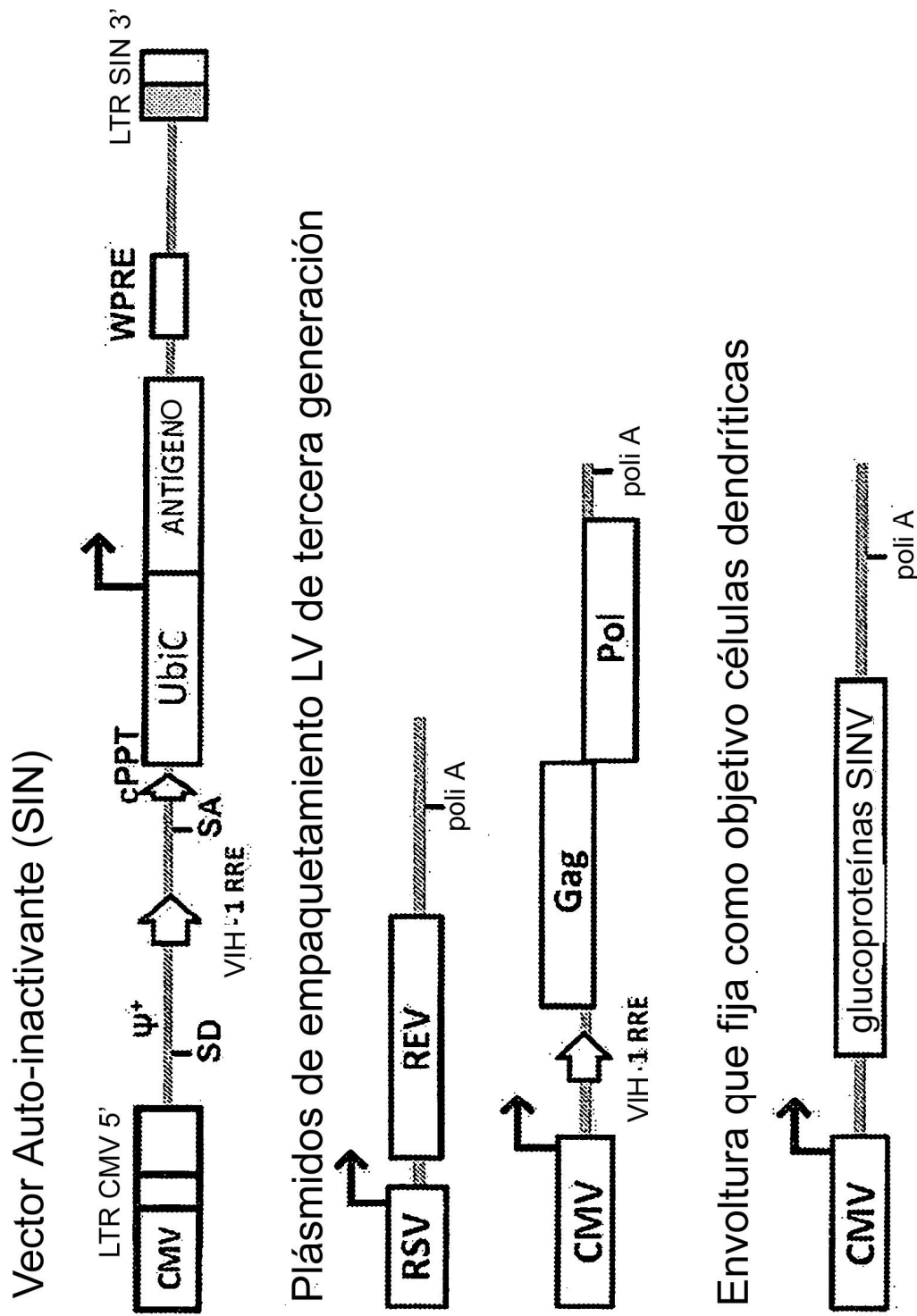


FIGURA 2

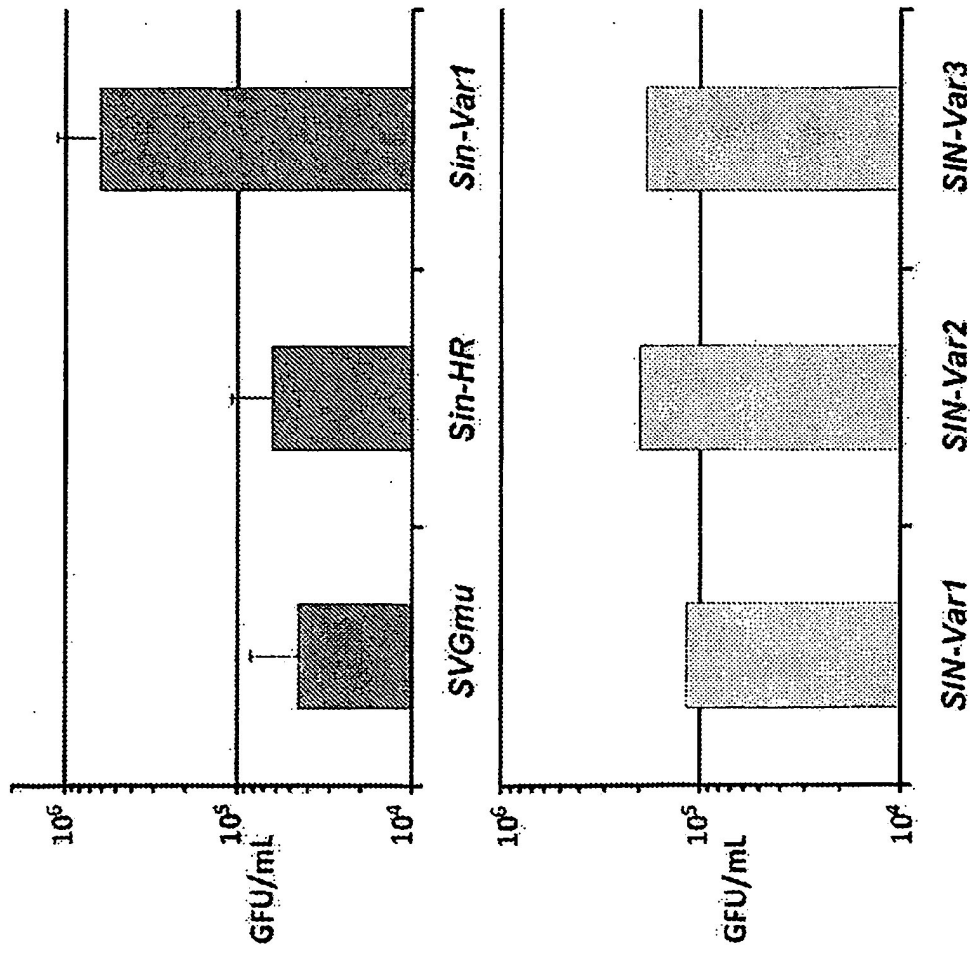


FIGURA 3

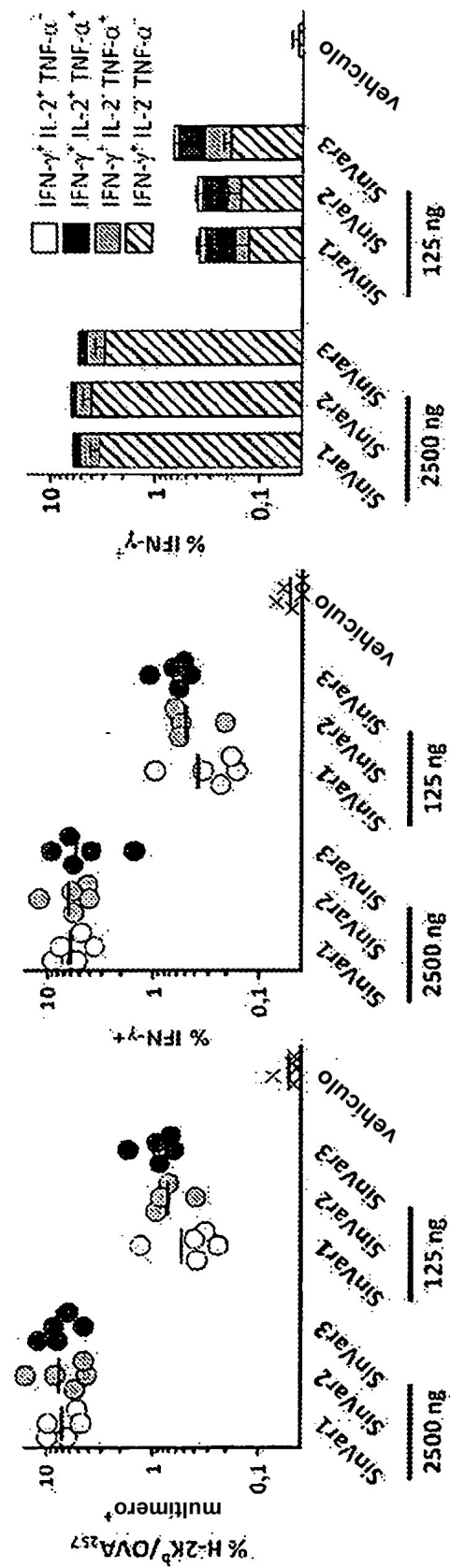


FIGURA 4A

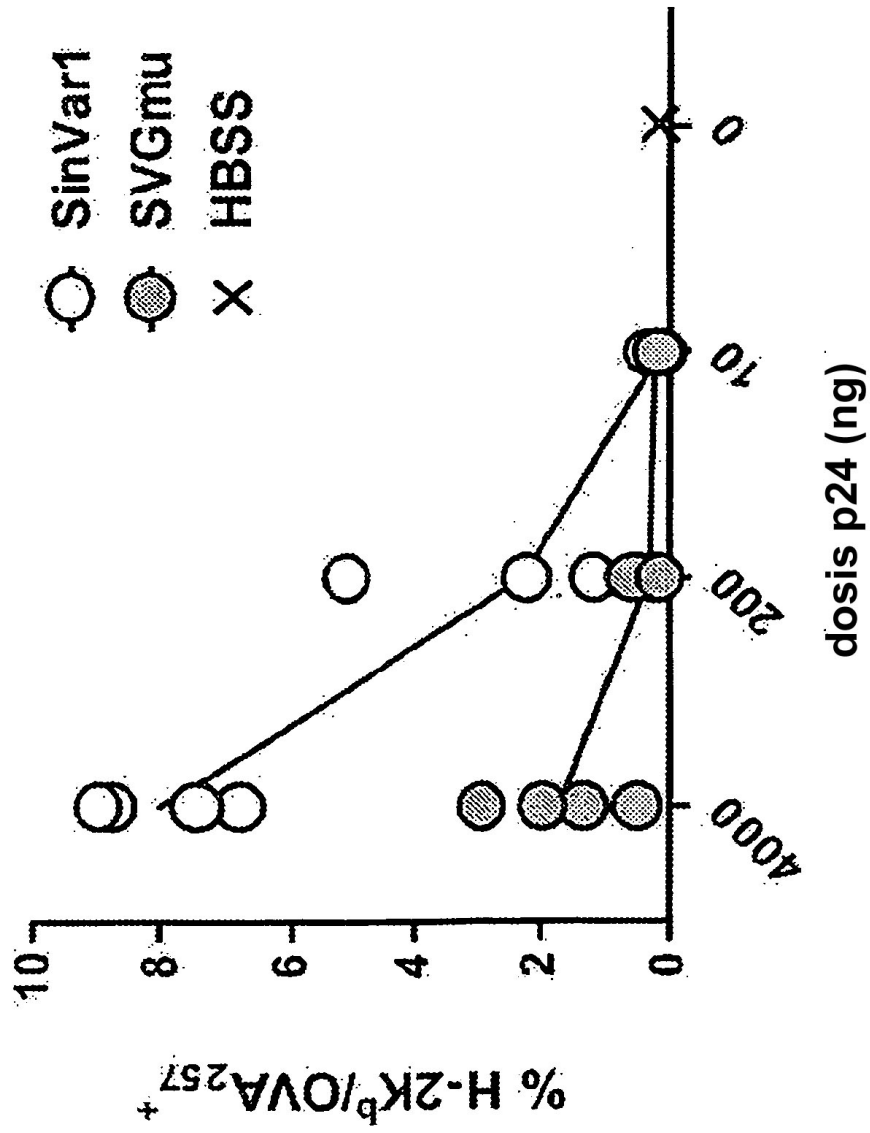


FIGURA 4B

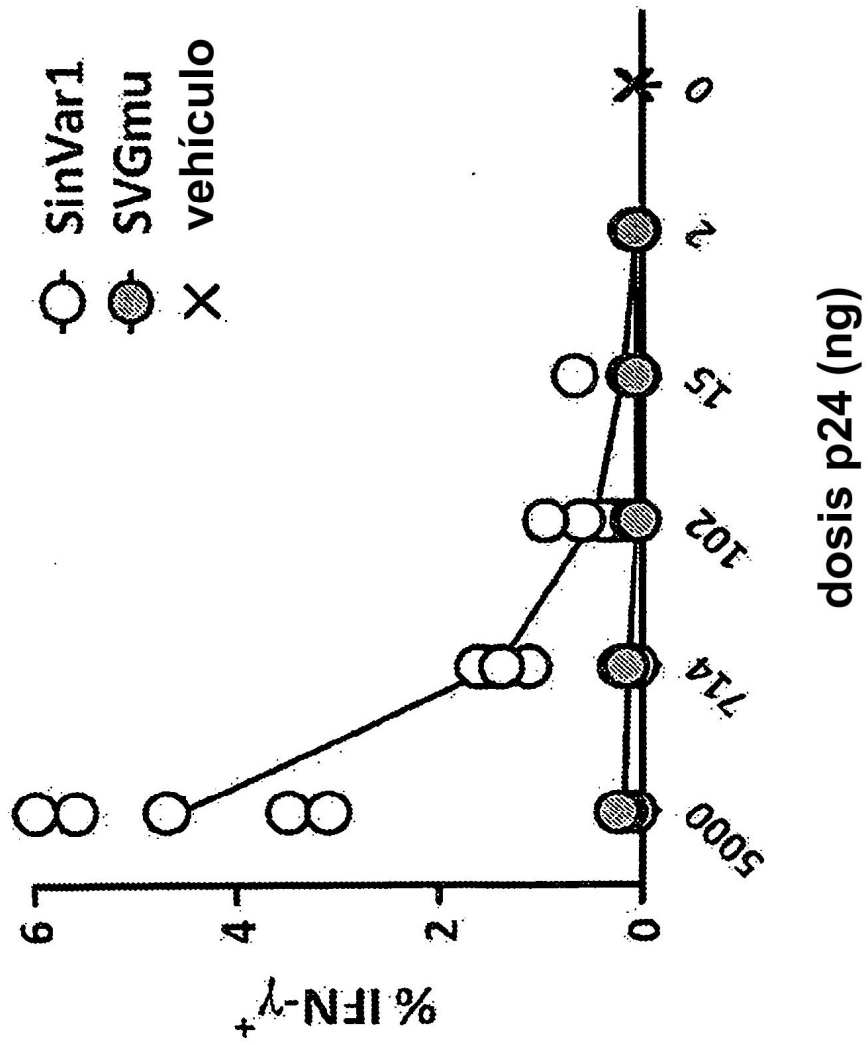


FIGURA 4C

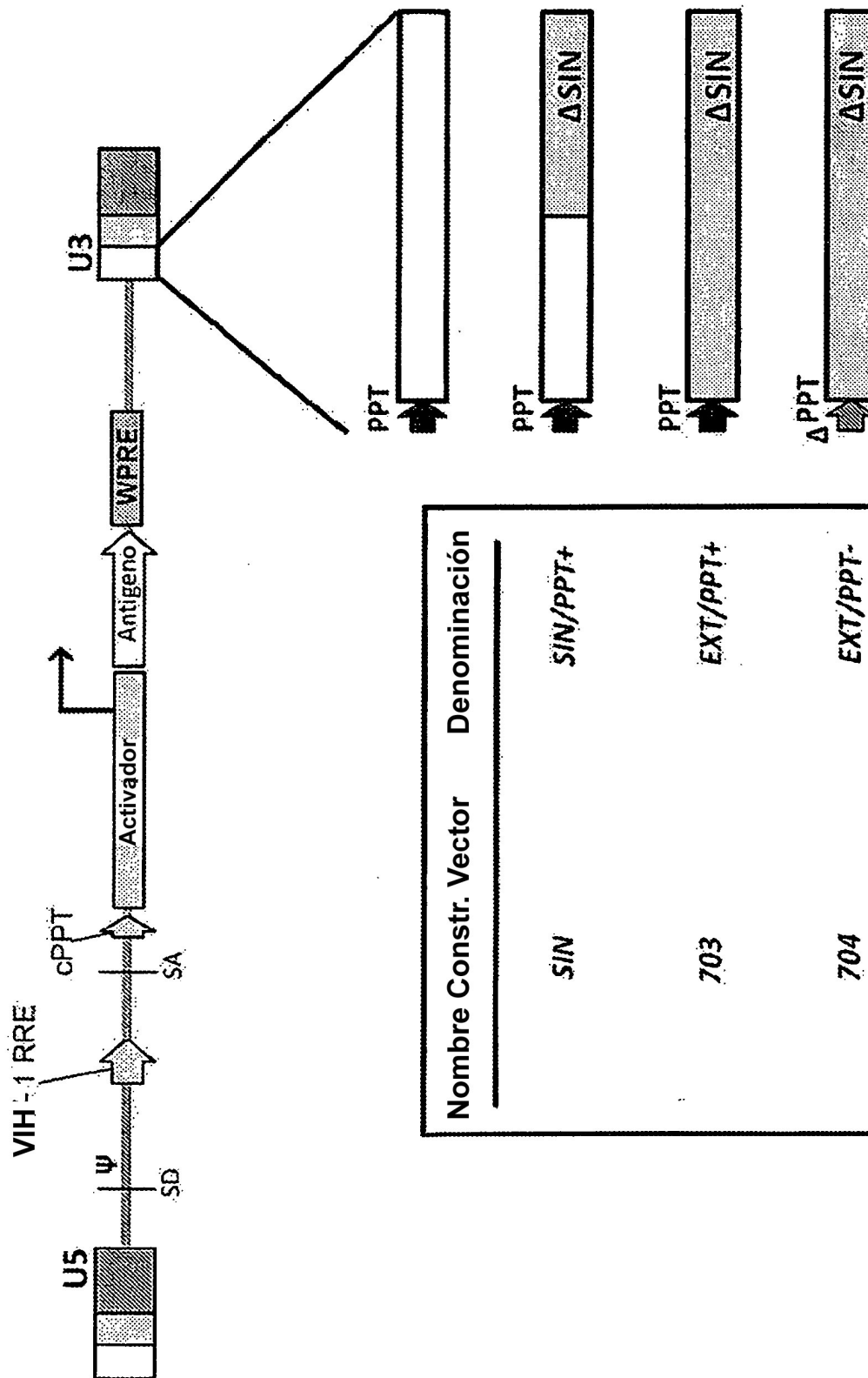


FIGURA 5A

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
SIN  CCTAGAAAACATGGAGCAATCACAAGTACATATACAGCGCTACCAATCTGATGTGCTGCGGTAGAGCACAAGAGG
703  CCTAGAAAACATGGAGCAATCACAAGTACATATACAGCGCTACCAATCTGATGTGCTGCGGTAGAGCACAAGAGG
704  CCTAGAAAACATGGAGCAATCACAAGTACATATACAGCGCTACCAATCTGATGTGCTGCGGTAGAGCACAAGAGG
      90      100     110     120     130     140     150     160
SIN  AGGAGGAGTGGGTTTCCAGTCACACCTCAGGTCACCTTACAGCCATTAAGCCAGCTGTATCTTTCGCCAC
703  AGGAGGAGTGGGTTTCCAGTCACACCTCAGGTCACCTTACAGCCATTAAGCCAGCTGTATCTTTCGCCAC
704  AGGAGGAGTGGGTTTCCAGTCACACCTCAGGTCACCTTACAGCCATTAAGCCAGCTGTATCTTTCGCCAC
      170     180     190     200     210     220     230     240
SIN  TTTTAAAGAAAGGGGGACTGGAGGCTATTTCATCCCAAGAGCAAGATATCTTGTCTGTGATCTACCA
703  TTTTAAAGAAAGGGGGACTGGAGGCTATTTCATCCCAAGAGCAAGATATCTTGTCTGTGATCTACCA
704  TTTTAAAGAAAGGGGGACTGGAGGCTATTTCATCCCAAGAGCAAGATATCTTGTCTGTGATCTACCA
      250     260     270     280     290     300     310     320
SIN  CACAAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTTCACAGGCGAGGATATCCATGATCTGATCTGATCTGCT
703  CACAAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTTCACAGGCGAGGATATCCATGATCTGATCTGATCTGCT
704  CACAAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTTCACAGGCGAGGATATCCATGATCTGATCTGATCTGCT
      330     340     350     360     370     380     390     400
SIN  ACAGCTAGTACCGGTGAGCAAGAGAGGATGAGAGGCAATGAGAGAGAGACACCGGTTGTACACCCCTGGAGC
703  ACAGCTAGTACCGGTGAGCAAGAGAGGATGAGAGGCAATGAGAGAGAGACACCGGTTGTACACCCCTGGAGC
704  ACAGCTAGTACCGGTGAGCAAGAGAGGATGAGAGGCAATGAGAGAGAGACACCGGTTGTACACCCCTGGAGC
      410     420     430     440     450     460     470     480
SIN  CTGCAATGGATGATGATCCCGGAGAGAGAGTATTAGAGTGAGGCTTTCAGCCGCTAGCATTTCATCATGCGCGG
703  CTGCAATGGATGATGATCCCGGAGAGAGAGTATTAGAGTGAGGCTTTCAGCCGCTAGCATTTCATCATGCGCGG
704  CTGCAATGGATGATGATCCCGGAGAGAGAGTATTAGAGTGAGGCTTTCAGCCGCTAGCATTTCATCATGCGCGG
      490     500     510     520     530     540     550     560
SIN  AGAGTGCATCCGAGCTGTACTGGGTCCTCTGTTTACACAGATCTGAGCTGAGAGCTCTCTGCTTACTAGGAGAC
703  AGAGTGCATCCGAGCTGTACTGGGTCCTCTGTTTACACAGATCTGAGCTGAGAGCTCTCTGCTTACTAGGAGAC
704  AGAGTGCATCCGAGCTGTACTGGGTCCTCTGTTTACACAGATCTGAGCTGAGAGCTCTCTGCTTACTAGGAGAC
      570     580     590     600     610     620     630     640
SIN  CACTGCTTAAGCCTCAATAAGCTTGGCTTGAAGTCTCAAGTACTGTCGCCCTCTGTTGTGACTCTGCTTACTAG
703  CACTGCTTAAGCCTCAATAAGCTTGGCTTGAAGTCTCAAGTACTGTCGCCCTCTGTTGTGACTCTGCTTACTAG
704  CACTGCTTAAGCCTCAATAAGCTTGGCTTGAAGTCTCAAGTACTGTCGCCCTCTGTTGTGACTCTGCTTACTAG
      650     660     670     680
SIN  AGATCCCTCAGACCTTTTATGTCAGTGTGGAATCTCTAGCA
703  AGATCCCTCAGACCTTTTATGTCAGTGTGGAATCTCTAGCA
704  AGATCCCTCAGACCTTTTATGTCAGTGTGGAATCTCTAGCA

```

FIGURA 5B

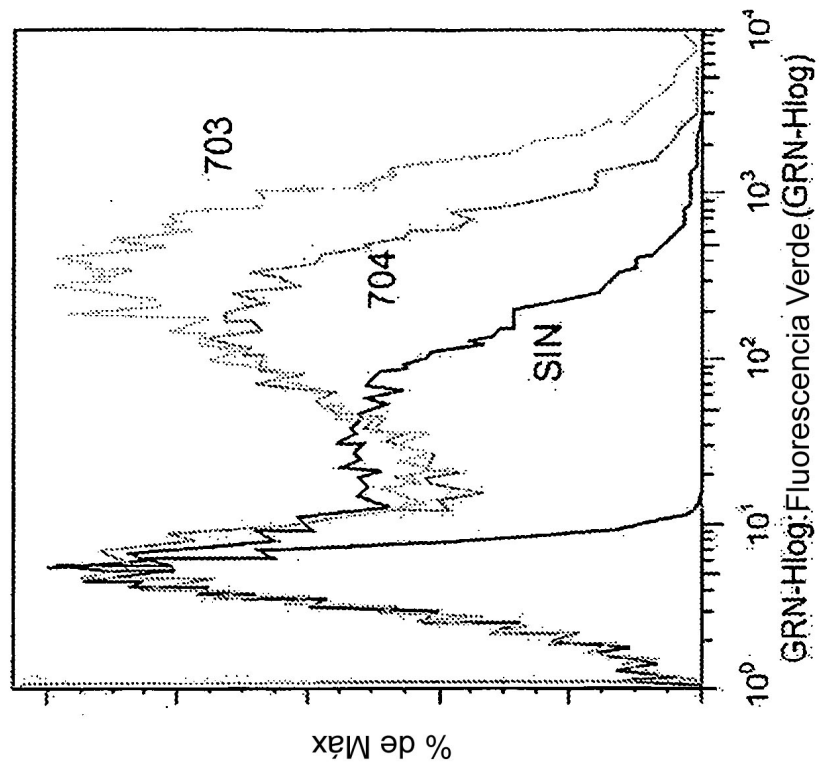


FIGURA 6A

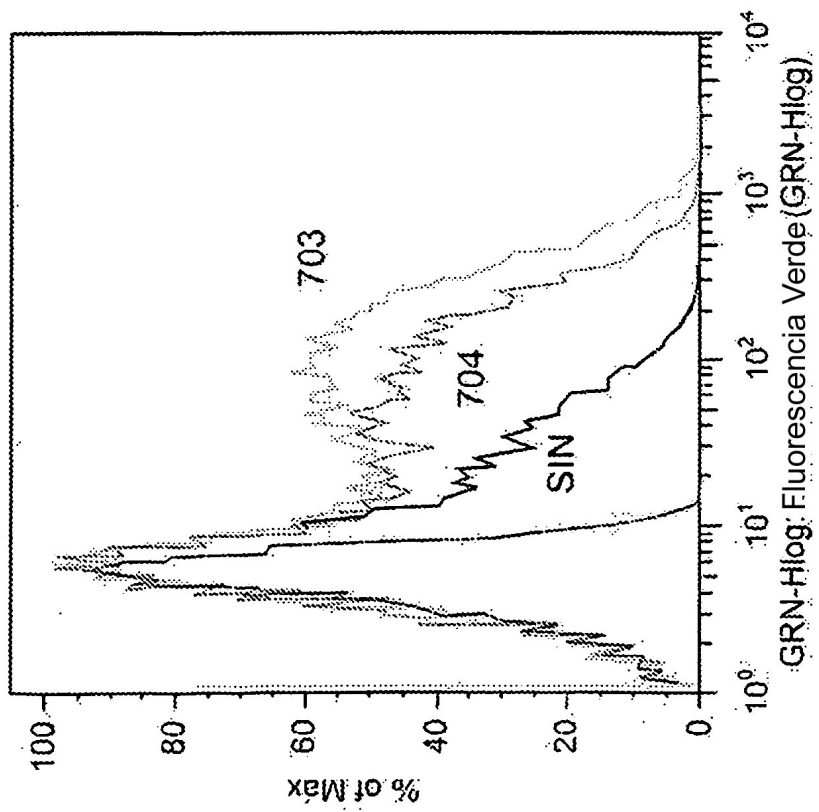


FIGURA 6B

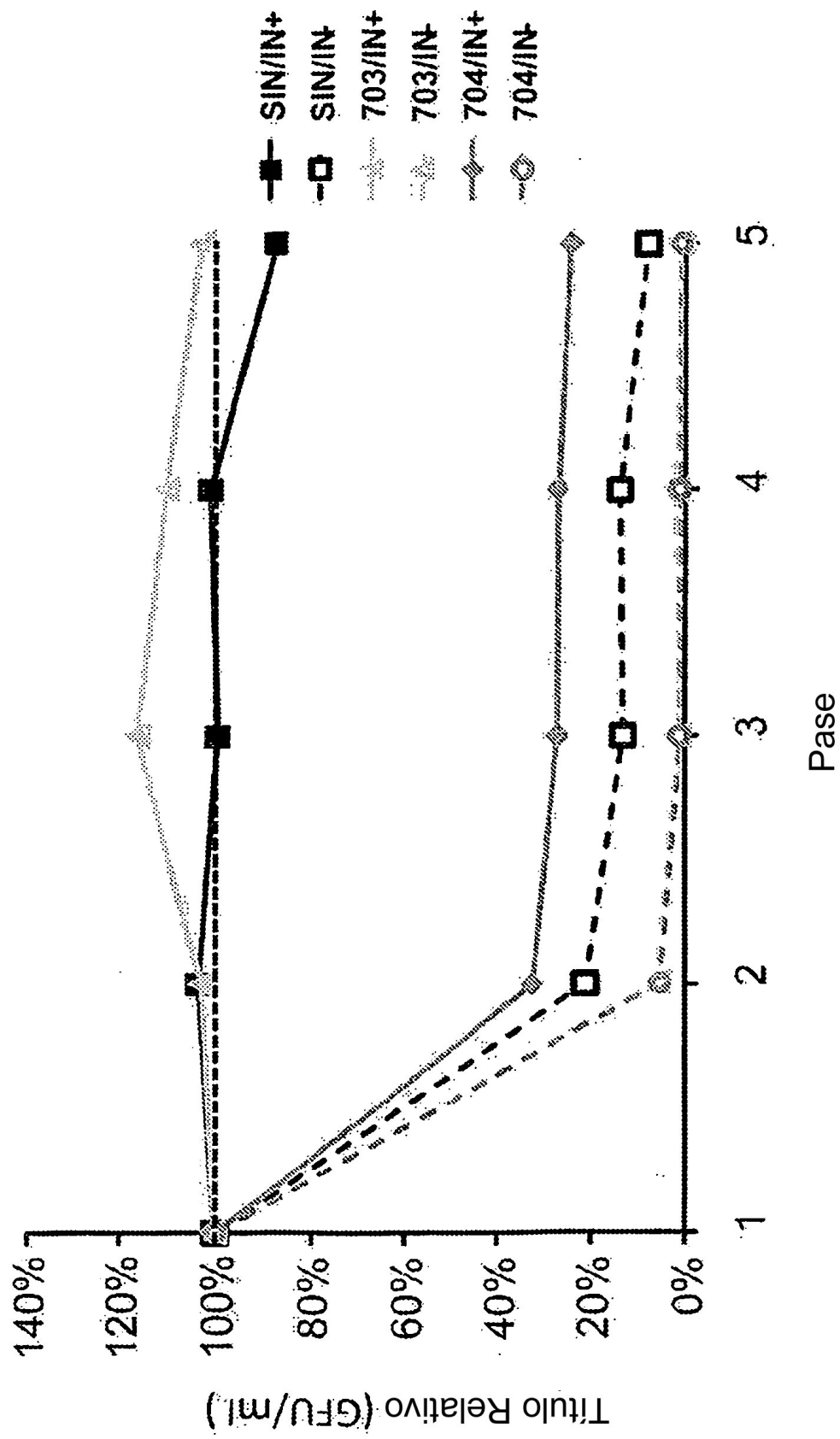


FIGURA 7

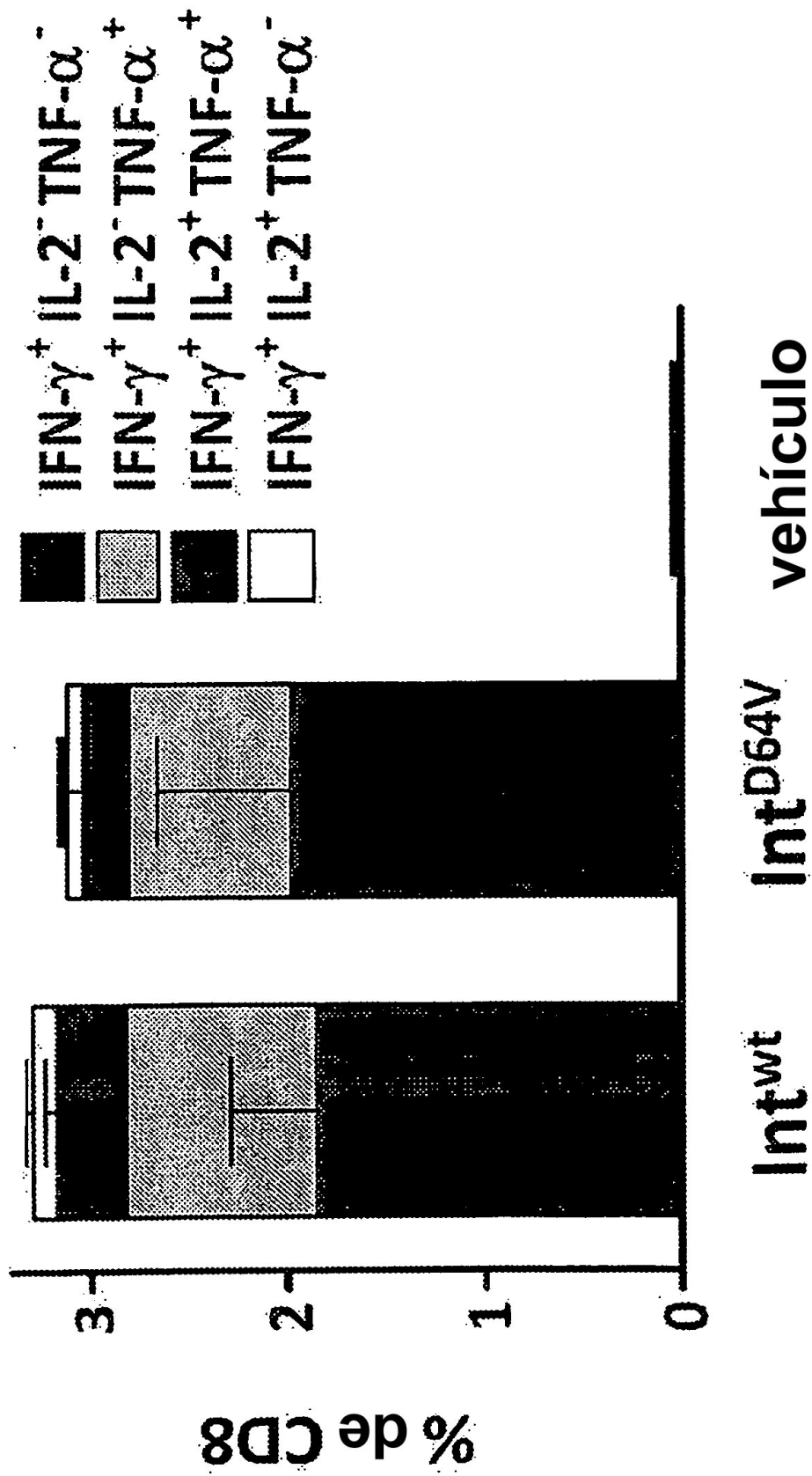


FIGURA 8

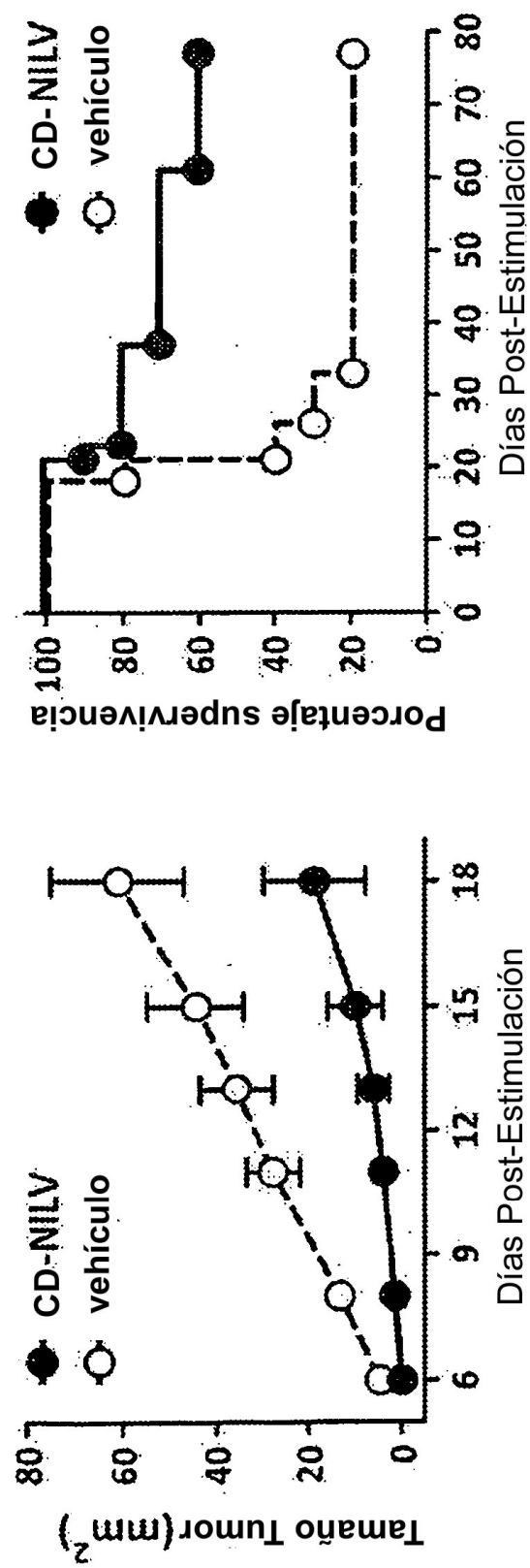


FIGURA 9