

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 103**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 35/768 (2015.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2014 PCT/US2014/042444**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14201449**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2014 E 14810447 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3008175**

54 Título: **Partículas inmunosupresivas similares a virus basadas en gammaretrovirus**

30 Prioridad:

15.06.2013 US 201361835545 P

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

27.02.2020

73 Titular/es:

**TOCAGEN INC. (100.0%)
3030 Bunker Hill Street Suite 230
San Diego, CA 92109, US**

72 Inventor/es:

**GRUBER, HARRY, E.;
JOLLY, DOUGLAS, J. y
LIN, AMY, H.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 745 103 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

Partículas inmunosupresivas similares a virus basadas en gammaretrovirus

Campo técnico

5 La descripción proporciona vectores de replicación retrovirales (RRV) y la identificación de uno o más componentes inmunosupresores que bloquean la producción de IFN tipo I por los RRV y/o reducen las respuestas de células tumorales al IFN lo que contribuye a la selectividad tumoral por los RRV.

Antecedentes

10 El interferón de tipo I parece que contribuye al desarrollo de la autoinmunidad y a la evolución de la enfermedad en múltiples enfermedades autoinmunitarias que incluyen lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR) y esclerosis múltiple (EM). En particular, los pacientes con LES a menudo tienen un alto nivel de producción de interferón tipo I (IFN) en su sangre y muestran una mayor expresión del perfil de expresión génica inducida por el IFN tipo I. La razón de la producción continua de IFN- α en estos pacientes parece que es causada por la activación continua de las células dendríticas plasmacitoides (pDC) mediada por inmunocomplejos tales como los autoanticuerpos a través de TLR7 y TLR9. Además, la observación clínica de que el tratamiento con IFN- α puede inducir autoinmunidad sugiere que la señalización de IFN tipo I juega un papel contribuyente en el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias.

15 Los vectores de replicación retrovirales (RRV) parece que son inmunógenos débiles, relativamente no inflamatorios, y, en modelos de tumores de roedores, se replican en tumores diana sin replicación extensa en ningún otro sitio en tejidos sanos.

20 Compendio

La descripción proporciona una composición inmunosupresora que comprende una partícula similar a virus (VLP) no envuelta, no replicante, que comprende una partícula viral desnuda que consiste en (i) polipéptidos gag y pol estructurales de un gammaretrovirus; y/o (ii) una poliproteína gag-pol gamma retroviral, en donde la VLP carece de un genoma viral, una envoltura lipídica y proteínas de la envoltura. En una realización, la VLP comprende uno o más componentes inmunosupresores asociados con un gammaretrovirus que bloquean la producción de IFN tipo I. En una realización adicional, los componentes inmunosupresores bloquean la activación de receptores tipo Toll (TLR) endosómicos en pDC y la posterior inducción de producción de IFN tipo I. En otra realización más de cualquiera de los anteriores, la descripción proporciona una composición que comprende una VLP de cualquiera y que además comprende un agente inmunosupresor adicional. En otra realización más, el agente inmunosupresor adicional es un anticuerpo anti-IFN α o fragmento del mismo. En otra realización más, el agente inmunosupresor adicional es un esteroide. En otra realización más, la composición es para usar en el tratamiento de un trastorno inmunitario.

35 La descripción también proporciona un método para tratar un trastorno inmunitario que comprende administrar a un sujeto una composición de cualquiera de las realizaciones anteriores, en donde se inhibe la actividad y/o producción de IFN α . En una realización, el trastorno inmunitario se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, polimiositis, dermatomiositis, espondiloartropatías tales como espondilitis anquilosante y síndrome de Sjogren. En otra realización, el trastorno inmunitario es el lupus eritematoso sistémico.

La descripción proporciona la identificación de uno o más componentes inmunosupresores asociados con vectores de replicación retrovirales (RRV) (p. ej., Toca 511) que contribuyen a la especificidad tumoral y eficacia de los RRV.

40 En una realización particular, la descripción proporciona que uno o más componentes inmunosupresores descritos en el presente documento bloquean la producción de IFN tipo I por los RRV. El uno o más componentes inmunosupresores de la descripción contribuyen a que los RRV no induzcan respuestas de IFN tipo I en células endoteliales primarias cultivadas o de fibroblastos no transformados, a que los RRV no induzcan respuestas de IFN tipo I en células tumorales cultivadas in vitro, y/o a que los RRV no induzcan IFN α tras la incubación con células dendríticas plasmacitoides (pDC). El uno o más componentes inmunosupresores descritos en el presente documento atenúan la inhibición de la replicación del RRV en células tumorales y/o atenúan la inducción de genes regulados por IFN en respuesta a una infección por el RRV. En otra realización, el uno o más componentes inmunosupresores descritos en el presente documento bloquean la activación de receptores tipo Toll (TLR) endosómicos en pDC y la posterior inducción de la producción de IFN tipo I.

50 La descripción proporciona que uno o más componentes inmunosupresores descritos en el presente documento contribuyen a la especificidad tumoral y a la eficacia de los RRV. Uno o más componentes inmunosupresores de la descripción están asociados con un RRV.

55 La descripción proporciona que uno o más componentes inmunosupresores descritos en el presente documento se pueden inactivar con calor, tal como calentando a 56°C durante 30 minutos, de modo que uno o más componentes ya no son inmunosupresores.

La descripción proporciona que uno o más componentes inmunosupresores descritos en el presente documento comprenden uno o más de los siguientes: proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. El uno o más componentes inmunosupresores de la descripción comprenden proteínas. El uno o más componentes inmunosupresores de la descripción comprenden partículas de proteína gag purificadas de un gammaretrovirus. Las partículas de proteína gag de gammaretrovirus se obtienen de MLV o GAIV.

La descripción proporciona que uno o más componentes inmunosupresores descritos en el presente documento facilitan la infección tumoral in vivo por un RRV.

Descripción de los dibujos

La Figura 1A-F proporciona la cinética de replicación de RRV-GFP en un panel de líneas celulares tumorales humanas y células primarias no transformadas. (A) HT-1080, (B) U87, (C) LN-CaP, (D) Sup-T1 (E) WI-38 y (F) HUVEC. Para cada línea celular, las células se infectaron con RRV-GFP con una MOI de 0.1 en el día 0 y se pasaron dos veces por semana. La cinética de replicación de cada vector se obtuvo representando gráficamente el porcentaje de células positivas para GFP frente al tiempo.

La Figura 2A-D presenta datos que indican que las células U87-MG responden a la señalización de IFN tipo I. Inducción de genes inducibles por IFN tipo I (A) PKR y (B) APOBEC3G, en un panel de líneas celulares establecidas fueron inducidas por IFN α exógeno con 200 U/ml. La inducción de PKR y APOBEC3G se midió a las 8, 16 y 24 horas después de la adición de IFN α por qRT-PCR. Se calculó el número de veces de inducción con respecto a las células no tratadas, y la expresión relativa de cada gen se expresa como $2^{-\Delta\Delta(Ct)}$. Los datos mostrados representan la media \pm DE, (n = 3). (C-D) Cinética de replicación de RRV-GFP en células U87-MG en presencia y ausencia de (C) IFN α y (D) IFN β . Rombo: sin tratar, cuadrado: tratado con IFN α o IFN β .

La Figura 3A-F proporciona una cinética de replicación de RRV-GFP e inducción de la señalización de IFN tipo I en células U87-MG resistentes a IFN α e IFN β . Cinética de replicación de RRV-GFP en (A) resistentes a IFN α (U87IRA) y (B) resistentes a IFN β (U87IRB) en ausencia de IFN α/β . Cinética de replicación de RRV-GFP en células (C) U87IRA y (D) U87IRB en ausencia y presencia de IFN α/β . Las células se infectaron con RRV-GFP con una MOI de 0.1 el día 0 y se pasaron dos veces por semana. (E-F) Inducción del gen inducible por IFN tipo I, PKR y APOBEC3G, en células U87-MG parentales, U87IRA y U87IRB. El ARNm celular se extrajo a las 16 horas después de la adición de IFN α o IFN β exógeno y los niveles de expresión se midieron por qRT-PCR. Se calculó el número de veces de inducción con respecto a las células no tratadas, y la expresión relativa de cada gen se expresa como $2^{-\Delta\Delta(Ct)}$. Los datos mostrados representan la media \pm DE, (n=3).

La Figura 4A-B proporciona datos que muestran la producción de IFN tipo I inducida por poli(I:C) y Toca 511 en células de fibroblastos CCD-1070Sk y de glioma U87-MG. Las células se transfectaron con poli(I:C) con 10 μ g/ml o se infectaron con Toca 511 con una MOI de 10. El líquido sobrenadante de cultivo de células no tratadas, tratadas con poli(I:C) y Toca 511 se recogió 8 horas después del tratamiento para medir por ELISA la cantidad de IFN α (B) e IFN β (A), respectivamente. Los datos mostrados representan la media \pm DE, (n = 3).

La Figura 5A-I presenta datos que indican que la producción de IFN α de pDC no es inducida por vectores retrovirales basados en MLV a menos que estén inactivados con calor, y que los vectores retrovirales basados en MLV pueden suprimir la inducción de IFN α por los vectores virales gamma-retrovirales inactivados con calor tales como MLV, o por vectores lentivirales naturales. (A) Toca 511 no induce la producción de IFN en pDC humanas. Las pDC aisladas de individuos sanos se estimularon con ODN2395, Toca 511 con MOI 1, 10 y 100 o vector lentiviral pseudotipado con VSV-G con MOI de 20. La producción de IFN α se midió 30 horas después de estimulación. (B) Transferencia Western de partes alícuotas de Toca 511 y Toca 511 pseudotipado con preparaciones de vectores VSV-G (Toca 511-G) desarrolladas con anticuerpos contra la glucoproteína de la envoltura anfotrópica (gp70), la proteína VSV-G y la proteína de la cápside (CA). (C) Permitir la entrada en pDC de Toca 511 a través de la envoltura de VSVg no conduce a la producción de IFN. Producción de IFN α de pDC estimuladas con Toca 511 o Toca 511-G con MOI de 20. (D) La inactivación por calor de Toca 511 conduce a la producción de IFN a partir de pDC humanas. Producción de IFN α de pDC estimuladas con Toca 511 o Toca 511-G con MOI de 20 con o sin inactivación con calor. (E) Bloqueo de la producción de IFN α por pDC estimuladas con la coincubación de Toca 511 y Toca 511 HI (inactivado con calor) o Toca 511 y LV-G. (F) Vectores retrovirales no replicativos con envolturas anfotrópicas o de VSVg y sin proteína glicoGag se comportan como Toca 511. Producción de IFN α de las pDC estimuladas con vectores retrovirales defectuosos en la replicación pseudotipados con proteína de la envoltura anfotrópica (MLV-A), VSV-G (MLV-G) y ambos (MLV-A + G) con MOI de 20. (G) La inactivación con calor de vectores retrovirales no replicativos conduce a la inducción de la producción de IFN por las pDC. Producción de IFN α de pDC estimuladas con vectores retrovirales defectuosos de la replicación basados en MLV inactivados con calor pseudotipados con proteína de la envoltura anfotrópica (MLV-A), VSV-G (MLV-G) y ambos (MLV-A + G) con MOI de 20. ODN2395 y el vector lentiviral pseudotipado con VSV-G con MOI de 20 se incluyeron como controles positivos. (H) Inmunotransferencias de Toca 511 tratado con calor y no tratado con calor y digestión enzimática con desglucodiasas, D; fosfolipasa C, P; o tripsina, T. (I) El bloqueo por Toca 511 natural de la inducción de la producción de IFN α en pDC por Toca 511 tratado con calor, se elimina mediante el tratamiento previo de Toca 511 natural con tripsina (T) pero no por el tratamiento previo de Toca 511 con desglucosilasa (D) o fosfolipasa (PLC) y

La figura 6A-B presenta un perfil de expresión génica de la ruta de IFN α / β en células U87-MG. Perfil de expresión génica de células U87-MG (A) tratadas con IFN β , o (B) infectadas con Toca 511 con una MOI de 10. Las células se recogieron 16 horas después del tratamiento seguido de qRT-PCT. La expresión génica se presenta como datos de regulación con respecto a las células no tratadas.

- 5 La figura 7 proporciona una curva que demuestra la cinética de replicación de RRV-GFP en células de fibroblastos humanos no transformadas. Las células de fibroblastos humanos no transformados (CCD-1070Sk) se infectaron con RRV-GFP con una MOI de 0.1. Las células infectadas se pasaron cada 3-4 días. Se recogió una porción de células en cada pase para medir el porcentaje de células positivas para GFP.

- 10 La Figura 8A-B proporciona diagramas que muestran la homología de secuencia entre el genoma viral de Toca 511 y el vector pBA9b. (A) Diagrama de superposición de secuencias entre el genoma viral de Toca 511 y el vector pBA9b. (B) Se identifican cuatro regiones ricas en GU en psi y 5' gag en Toca 511 (resaltadas), y las primeras 3 regiones están presentes en el vector pBA9b. El ATG subrayado indica el codón de inicio del polipéptido gag. El asterisco indica dónde termina la secuencia gag en el vector pBA9b (SEQ ID NO: 4).

- 15 La Figura 9 presenta un gráfico de barras que demuestra la producción de IFN α de pDC humanas inducida por vectores retrovirales basados en MLV. Las pDC aisladas de bazos de ratones Balb/c se estimularon con ODN2395, Toca 511 con MOI de 100 o vector lentiviral pseudotipado con VSV-G con MOI de 20 (LV-G). La producción de IFN α se midió 30 horas después de la estimulación.

- 20 La Figura 10A-E muestra que el o los componentes inmunosupresores e inmunoestimuladores asociados con Toca 511 son independientes de la glucoproteína de la envoltura anfotrópica y el ácido nucleico viral. (A) Sin estimulación de la producción de IFN α de pDC estimuladas con vectores retrovirales de replicación defectuosa pseudotipados con proteína de envoltura anfotrópica (MLV-A), VSV-G (MLV-G) y ambas (MLV-A + G) con MOI de 20; ODN2395 y el vector lentiviral pseudotipado con VSV-G (LV-G) con moi de 20 son controles positivos e inducen la producción de IFN α ; Toca 511 es el control negativo. (B) Producción de IFN α de pDC estimuladas con vectores retrovirales que no se replican, tratados con calor, pseudotipados con proteína de envoltura anfotrópica (MLV-A), VSV-G (MLV-G) y ambas (MLV-A + G) con una MOI de 20. ODN2395 y el vector lentiviral pseudotipado con VSV-G con una MOI de 20 se incluyeron como controles positivos. (C) VLP tratada con calor y VLP/pBA9b inducían la producción de IFN α en pDC, mientras que las versiones naturales no están activas. (D) Se añadieron Toca 511 y VLP marcadas con CFSE a las pDC a 37°C para permitir la internalización. Las células se recogieron a las 2 h y 6 h después de la incubación. El control representa células incubadas con colorante dializado solo para evaluar la fluorescencia de fondo. (E) Producción de IFN α de pDC estimuladas con Toca 511 tratado con calor o no tratado con calor, con y sin digestión enzimática. P = Fosfolipasa C; D = Desglucosilasa; T = tripsina El asterisco (*) indica la incubación conjunta de pDC con enzima sola.

- 35 La figura 11A-E muestra diversas construcciones usadas en la descripción. (A) Un mapa de vector esquemático del vector de replicación retroviral basado en MLV con casete de transgén IRES. (B) Un mapa de vector esquemático del vector de replicación retroviral basado en MLV. (C) Un mapa de vector esquemático del vector retroviral que no se replica basado en MLV. (D) Un mapa de vector esquemático de pCMV-gag-pol para generar partículas similares a virus (VLP) retrovirales basadas en MLV en células 293GP. (E) Inmunotransferencia de la proteína de la cápside de partículas similares a virus.

Descripción detallada

- 40 Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "y" y "el" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un componente inmunosupresor" incluye una pluralidad de dichos componentes y la referencia al "vector de replicación retroviral" incluye referencia a uno o más vectores de replicación retrovirales y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

- 45 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente el experto en la técnica. Aunque muchos métodos y reactivos son similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, se presentan en el presente documento métodos y materiales ilustrativos.

- 50 Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se proporcionan con el propósito de describir y divulgar las metodologías, que se podrían usar en relación con la descripción del presente documento.

Además, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. De manera similar, "comprender", "comprende", "que comprende", "incluir", "incluye" y "que incluye" son intercambiables y no pretenden ser limitantes.

- 55 Debe entenderse además que cuando las descripciones de diferentes realizaciones usan el término "que comprende", los expertos en la técnica entenderán que en algunos casos específicos, una realización se puede describir alternativamente usando el lenguaje "que consiste esencialmente en" o "que consiste en".

Los retrovirus se han clasificado de varias maneras, pero la nomenclatura se ha estandarizado en la última década

(véase ICTVdB - The Universal Virus Database, v 4 en la World Wide Web (www) en ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/ y el libro de texto "Retroviruses" Eds. Coffin, Hughs y Varmus, Cold Spring Harbor Press 1997). Las composiciones descritas en el presente documento se obtienen o derivan de ortoretrovirus o más típicamente gammaretrovirus e incluso más específicamente, en ciertas realizaciones, de oncoretrovirus de mamífero (p. ej., MLV, GLV, FELV y similares).

Como se usa en el presente documento, la expresión "interferón tipo I" se define para incluir todos los subtipos de interferones tipo I de secuencia natural de cualquier especie de mamífero, que incluyen interferón- α , interferón- β , interferón-delta, interferón- Ω e interferón-tau. De manera similar, la expresión "interferón tipo I humano" se define para incluir todos los subtipos de interferones humanos tipo I de secuencia natural, que incluyen las clases de interferón- α , interferón- β e interferón- Ω humanos y que se unen a un receptor celular común.

A menos que se indique expresamente lo contrario, los términos "interferón- α ", "IFN- α " e "interferón- α humano", "IFN- α humano" y "hIFN- α " se usan en el presente documento para referirse a todas las especies de interferones alfa humanos de secuencia natural, que incluyen todos los subtipos de interferón α humano de secuencia natural. El interferón α humano natural (secuencia natural) comprende 23 o más proteínas estrechamente relacionadas codificadas por genes distintos con un alto grado de homología estructural (Weissmann y Weber, *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.*, 33: 251, 1986; *J. Interferon Res.*, 13: 443-444, 1993; Roberts et al., *J. Interferon Cytokine Res.* 18: 805-816, 1998). El locus del IFN- α humano comprende dos subfamilias. La primera subfamilia consiste en al menos 14 genes no alélicos funcionales, que incluyen los genes que codifican IFN- α A (IFN- α 2), IFN- α B (IFN- α 8), IFN- α (IFN- α 10), IFN- α D (IFN- α 1), IFN- α E (IFN- α 22), IFN- α F (IFN- α 21), IFN- α G (IFN- α 5), y IFN- α H (IFN- α 14), y pseudogenes que tienen al menos 80% de homología. La segunda subfamilia, α_{11} u Ω , contiene al menos 5 pseudogenes y un gen funcional (denominado aquí "IFN- α_{11} " o "IFN- Ω ") que presenta 70% de homología con los genes de IFN- α (Weissmann y Weber, 1986, véase antes).

La descripción proporciona composiciones y métodos útiles en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios mediante la modulación de la ruta del interferón tipo I. Las composiciones se pueden usar solas o en combinación con otras composiciones moduladoras de interferón.

En general, una limitación potencial para la replicación de virus como agentes antineoplásicos es lograr suficiente propagación viral dentro de la masa tumoral antes del aclaramiento inmune del virus. La naturaleza no citolítica de los vectores de replicación retrovirales (RRV) puede hacer que sean menos propensos a desencadenar respuestas inmunitarias innatas en comparación con virus oncolíticos como los basados en adenovirus o virus vaccinia. Los RRV parece que son relativamente no inflamatorios, inmunógenos débiles y, en modelos de tumores en roedores, se replican en tumores diana sin replicación extensa en otra parte en tejidos sanos. Esta última propiedad se ha demostrado en modelos de cáncer cerebral en ratas y ratones inmunocompetentes y en perros con gliomas de alto grado. Además, hay una eliminación rápida del virus detectable tras infundir en monos normales preparaciones de retrovirus de replicación murinos anfotrópicos. Además, estas mismas propiedades de RRV se han observado en seres humanos (p. ej., ensayos clínicos con Toca 511, Tocagen Inc., San Diego, CA). Toca 511 es un RRV que comprende una proteína de envoltura anfotrópica y codifica una citosina desaminasa derivada de levadura diseñada para convertir 5-fluorocitosina en 5-fluorouracilo en tumores infectados.

Se ha especulado previamente que la especificidad tumoral de RRV surge de una combinación de la necesidad de replicarse en objetivos celulares para la infección productiva por gammaretrovirus y defectos comunes en las rutas de señalización inmunitarias celulares innatas en las células tumorales. Se cree que la respuesta inmunitaria innata, además de constituir un sistema directo de defensa inmunitaria, es un precursor necesario para la inmunidad adaptativa. Además, las actividades de restricción viral, tales como APOBEC3G, teterina y otros factores de restricción del hospedante, son en general efectores posteriores inducidos por los IFN tipo I que son inducidos por activación de las rutas de señalización inmunitaria innatas a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR).

La descripción demuestra que los RRV son menos inflamatorios y tienen una capacidad relativamente atenuada para estimular el sistema inmunitario innato de lo que se sabía previamente. Estas propiedades de los RRV explican, en parte, la falta de eliminación viral de los tumores por la respuesta inmunitaria adaptativa y también la replicación permisiva de virus en estos tumores.

La respuesta inmunitaria innata es mediada predominantemente por la interacción de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) con PRR presentes en la superficie celular o dentro de los compartimentos intracelulares. Los PRR que detectan componentes virales incluyen receptores tipo toll (TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 y TLR10), receptores tipo RIG-I (RIG-1 y MDA5), PKR, DAI y STING. Tras la inducción de PRR, se produce IFN α/β para activar la ruta de señalización del IFN tipo I de forma autocrina o paracrina, lo que posteriormente conduce a la activación de un estado antiviral en las células.

Células de varios tipos de cánceres tienen defectos en la ruta de señalización del IFN tipo I con el fin de evitar la muerte celular y/o promover la proliferación celular, proporcionando así un nicho óptimo para la infección viral y la replicación dentro de las células de dichos cánceres. Se han descrito defectos en la señalización de IFN tipo I, que incluye IRF3 y STAT1, así como en la eliminación en el receptor de IFN tipo I en células tumorales, incluidas las

células de glioma humano. El concepto de que las células tumorales desarrollan defectos en la señalización de IFN tipo I con el fin de mantener el crecimiento tumoral y que estos defectos permiten la replicación de virus que son sensibles al IFN tipo I se ha demostrado en virus oncolíticos tales como el virus de la estomatitis vesicular (VSV).

5 Esta descripción demuestra que los elementos del RRV son útiles para modular la actividad dependiente de IFN tipo I. La descripción proporciona una correlación entre la infección por RRV y la respuesta antiviral dependiente de IFN tipo I en células tumorales humanas y células normales. Los resultados presentados en el presente documento demuestran que aunque la replicación del RRV se inhibe notablemente por el tratamiento con interferón exógeno, la infección por RRV es un suceso menos inflamatorio que para otros virus, incluidos los vectores lentivirales. Estos datos ponen de manifiesto que el RRV anfotrópico basado en MLV no desencadena directamente la respuesta de IFN tipo I en células derivadas de tumores de glioma humano sensible a IFN o en células de fibroblastos y endoteliales no transformadas cultivadas. Los datos también proporcionan la primera prueba directa de que un componente inmunosupresor asociado con partículas de RRV suprime activamente la activación de los TLR en células dendríticas plasmacitoides (pDC). La inhibición de la producción de IFN tipo I por los RRV combinada con la respuesta reducida al IFN tipo I en células de cáncer está de acuerdo con la replicación selectiva de RRV anfotrópicos basados en MLV en tumores sin eliminación viral.

15 La descripción demuestra una diferencia cualitativa en las respuestas de interferón al RRV en comparación con otros vectores virales comunes, que es consistente con la eficiente propagación específica de tumor observada y eficacia en modelos de ratón con glioma ortotópico y en glioblastomas en pacientes humanos. En los estudios descritos en el presente documento, las células promotoras de tumores (p. ej., glioma humano y otras células tumorales, fibroblastos, células endoteliales y pDC que se parecen a parte del microambiente tumoral) cuando están infectadas por vectores virales demostraron la interacción entre los RRV basados en MLV y la respuesta antiviral dependiente de IFN tipo I.

20 La descripción posterior demuestra que los RRV son sensibles al IFN α y β exógenos, y que el menor nivel de respuesta a la inducción génica observada en células de cáncer (p. ej., HT1080 y U87-MG) está de acuerdo con el concepto de que las células tumorales tienen defectos en la ruta de IFN tipo I. Sin embargo, en los estudios presentados en el presente documento, los RRV basados en MLV no provocaban una respuesta antiviral mediada por IFN tipo I tras la infección viral de células tumorales o fibroblastos no transformados y células endoteliales primarias, y la falta de una respuesta antiviral mediada por IFN no es debida a la incapacidad de las células para producir IFN tipo I.

25 Adicionalmente, la descripción demuestra además que RRV-GFP no se replicaba de forma más eficaz en células resistentes a IFN α / β que las células parentales en ausencia de IFN α / β . Por lo tanto, no son necesarios defectos más extremos en la señalización de IFN tipo I en células hospedantes para la infección productiva con RRV basados en MLV, en estos sistemas in vitro, pero los defectos en la señalización de IFN pueden tener una función permisiva en tumores in vivo. Además, es posible que la supresión activa de la inducción de IFN observada en células humanas pueda ocurrir también en fibroblastos y células endoteliales. Cabe destacar que los sensores de ácido nucleico citosólico recientemente descubiertos, que incluyen HMGB, TREX1, cGAS y DHX9/36 implicados en la respuesta inmunitaria celular innata, también pueden tener una función en este bloqueo.

30 Aunque los IFN tipo I se han implicado como factores importantes para la inmunidad antiviral en las primeras etapas de la infección con la cepa Friend de MLV (FV). TLR7 y Myd88 pueden proporcionar una función en la mediación de la respuesta de anticuerpos contra la infección por retrovirus en ratones. La activación de la respuesta innata a través del IFN tipo I puede ser prescindible en cepas de ratones resistentes debido a su respuesta de anticuerpos robusta y duradera. El requisito de TLR7 para la generación de anticuerpos anti-MLV específicos de virus se demostró en ratones con inactivación de TLR7. Además, usando el modelo de inactivación de IFN α R, se demostró que la respuesta de IFN tipo I no era necesaria para desencadenar una respuesta inmunitaria adaptativa en ratones resistentes. Supuestamente, en el contexto de la infección retroviral basada en MLV, los seres humanos pueden funcionar de manera similar a las cepas de ratones resistentes, de modo que la respuesta de IFN α / β tipo I es prescindible, y el alto nivel base de APOBEC3G en células inmunitarias en reposo controla la replicación viral inicial seguida de respuesta de anticuerpos robusta.

35 Aunque los IFN tipo I se han implicado como factores importantes para la inmunidad antiviral en las primeras etapas de la infección con la cepa Friend de MLV (FV). TLR7 y Myd88 pueden proporcionar una función en la mediación de la respuesta de anticuerpos contra la infección por retrovirus en ratones. La activación de la respuesta innata a través del IFN tipo I puede ser prescindible en cepas de ratones resistentes debido a su respuesta de anticuerpos robusta y duradera. El requisito de TLR7 para la generación de anticuerpos anti-MLV específicos de virus se demostró en ratones con inactivación de TLR7. Además, usando el modelo de inactivación de IFN α R, se demostró que la respuesta de IFN tipo I no era necesaria para desencadenar una respuesta inmunitaria adaptativa en ratones resistentes. Supuestamente, en el contexto de la infección retroviral basada en MLV, los seres humanos pueden funcionar de manera similar a las cepas de ratones resistentes, de modo que la respuesta de IFN α / β tipo I es prescindible, y el alto nivel base de APOBEC3G en células inmunitarias en reposo controla la replicación viral inicial seguida de respuesta de anticuerpos robusta.

40 A pesar de la comprensión actual del papel funcional de Myd88 y TLR7 en las respuestas anti-MLV, y la implicación de que el ARN retroviral interacciona con TLR7 en una entrada post-viral del compartimento endosómico, no se encontró en los estudios presentados en el presente documento que TLR7 en las pDC fuera activado mediante replicación o vectores retrovirales defectuosos con glucoproteínas de la envoltura anfotrópicas, VSV-G o ambas, a menos que los vectores virales hubieran sido inactivados con calor antes de la exposición a las pDC. Es interesante que la capacidad de las partículas similares a virus (VLP) en ausencia del ARN retroviral para inducir la producción de IFN α en pDC sugiere que hay otro PAMP, además del ARN retroviral, presente en Toca 511. Además, los experimentos usando vectores retrovirales no replicativos basados en MLV pseudotipados con glucoproteínas de la envoltura anfotrópicas y VSV-G, así como con VLP, condujeron a la identificación de un componente inmunosupresor adicional, distinto de la glucoproteína de la envoltura anfotrópica, asociada con los RRV. Por lo tanto, indica la presencia de un PAMP adicional distinto del ARN viral y un componente inmunosupresor asociado con partículas virales basadas en MLV. Además, la exposición de partículas virales basadas en MLV tratadas con calor conduce simultáneamente a la exposición del PAMP encriptado y la inactivación del componente

inmunosupresor, lo que conduce a la producción de IFN α en pDC. También es importante tener en cuenta que los vectores no replicantes basados en MLV generados en estos estudios, que son capaces de inducir la producción de IFN α en pDC humanas bajo tratamiento con calor, no expresan glico-Gag. El fragmento N-terminal de glico-Gag expresado a partir de RRV ha mostrado que se incorpora en partículas virales MLV y tiene una función en la inhibición de la función de APOBEC3 en las células diana. Los datos sugieren que esta inhibición de APOBEC3 se produce a través de un mecanismo que es distinto de la actividad regulada por IFN tipo I. Además, dado que tanto el vector de HIV-1 como las VLP pueden inducir la producción de IFN α en las DC (supuestamente mediada a través de rutas de TLR7 e independientes de TLR7, respectivamente), los datos actuales muestran que Toca 511 puede inhibir activamente la producción de IFN α inducida por el vector lentiviral en pDC lo que sugiere que la inhibición puede ser a través de un componente corriente abajo común en las rutas de TLR7 e independientes de TLR7.

Puesto que se sabe que las partículas retrovirales hechas a partir de diferentes tipos de células incorporan diferentes proteínas celulares, los datos sugieren que los componentes inmunosupresores e inmunoestimuladores probablemente se deben a constituyentes virales. Esta hipótesis es respaldada además por los resultados de vectores producidos a partir de una línea celular productora canina que tienen propiedades similares a los vectores producidos a partir de líneas celulares humanas. El respaldo adicional de que los constituyentes virales sean los componentes activos para la inmunosupresión proviene de los resultados que muestran que la coinubación de microvesículas asociadas a proteínas de envoltura anfotrópicas producidas por transfección transitoria en 293T y VLP tratadas con calor que carecen del ARN viral, no suprime la inducción de la producción de IFN α en pDC. Sin embargo, es posible que diferentes proteínas del hospedante en partículas virales producidas a partir de diferentes células medien este bloqueo.

La descripción también indica que los vectores basados en MLV defectuosos en la replicación generados en los estudios en el presente documento, que son capaces de inducir la producción de IFN α en pDC humanas bajo tratamiento térmico, no expresan glico-gag (Pr80gag). Por consiguiente, en otra realización, Pr80gag juega poco o nada en el o los componentes de regulación de interferón asociados con partículas virales RRV. Además, puesto que tanto el vector de HIV-1 como las VLP pueden inducir la producción de IFN α en las DC (supuestamente mediada por las rutas de TLR7 e independiente de TLR7, respectivamente), los datos presentados en el presente documento indican que Toca 511 puede inhibir activamente la producción de IFN α inducida por el vector lentiviral en las pDC (véase la figura 5E) lo que sugiere que la inhibición puede ser a través de un componente corriente abajo común en las rutas de TLR7 e independientes de TLR7.

La descripción proporciona que la respuesta de IFN tipo I en células tumorales, fibroblastos no transformados, células endoteliales primarias o pDC no es inducida por RRV basado en MLV anfotrópico. Por lo tanto, los hallazgos presentados en el presente documento corroboran que la proliferación celular es un determinante importante para apoyar la replicación de RRV, y a diferencia de VSV, otros virus oncolíticos y vectores lentivirales, los RRV no inducen actividad inmunitaria innata celular en cultivos celulares. Sin embargo, la descripción no descarta que pueda haber un mecanismo in vivo de inducción de IFN tipo I, que no sea a través de las células probadas en el presente documento, que suprima la replicación viral en el tejido normal y, sin embargo, permita la replicación específica tumoral observada en algunos modelos de tumores de ratón, y en perros y seres humanos con gliomas. Además, la descripción indica que el posible sitio del tumor tiene una función importante en si existe o no inducción in vivo de IFN tipo I que controla la replicación viral. Además, se han descrito muchos mecanismos en tumores para crear un privilegio inmunitario, como la regulación por disminución de la inmunidad adaptativa que podría contribuir a la replicación selectiva en tumores.

Basándose en lo anterior y los ejemplos a continuación, la descripción proporciona la identificación de un componente o componentes inmunosupresores asociados con las partículas de RRV. La composición comprende una partícula similar a virus (VLP) derivada de un gammaretrovirus. La VLP comprende un polipéptido gag y pol estructural y/o funcional. En una realización particular, una glucoproteína de envoltura anfotrópica no es el componente inmunosupresor asociado con las partículas de RRV. Por consiguiente, la VLP carece de una envoltura. La VLP de la descripción se puede producir por transducción de un tipo de célula adecuado con un sistema viral defectuoso de replicación que incluye un polinucleótido que comprende un gen gag-pol operativamente unido a un promotor heterólogo (p. ej., un promotor de CMV; véase, p. ej., la Figura 11D). La envoltura se puede quitar para proporcionar la VLP nuclear (K.B. Andersen, *Virus Research* 175: 134-142 (2013)). La VLP nuclear (la VLP nuclear autoensamblada con Gag también se puede hacer a partir de la expresión bacteriana y autoensamblado de proteínas gag (Y. Morikawa *J. Biol. Chem* 279: 31964-31972, 2004).

Como se usa en el presente documento, la expresión "partícula similar a virus" o "VLP" se refiere a una cubierta viral no replicativa, derivada de cualquiera de varios virus que se describen con más detalle más adelante. Las VLP en general están compuestas de una o más proteínas virales, tales como, pero no limitadas a las proteínas denominadas proteínas de cápside, recubrimiento, cubierta, superficie y/o envoltura, o polipéptidos que forman partículas derivados de estas proteínas. Las VLP se pueden formar espontáneamente tras la expresión recombinante de la proteína en un sistema de expresión adecuado. Los métodos para producir VLP particulares se conocen en la técnica y se describen de forma más completa más adelante. La presencia de VLP después de la expresión recombinante de proteínas virales se puede detectar usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como microscopía electrónica, cristalografía de rayos X y similares. Véase, p. ej., Baker et al., *Biophys J.* (1991) 60: 1445-1456; Hagensee et al., *J. Virol.* (1994) 68: 4503-4505. Por ejemplo, las VLP se pueden aislar por

centrifugación en gradiente de densidad y/o identificar por bandas de densidad características. Alternativamente, la microscopía de crioelectrones se puede realizar en muestras acuosas vitrificadas de la preparación de VLP en cuestión, y las imágenes se registran en condiciones de exposición adecuadas.

5 Una partícula similar a virus (VLP) de la descripción incluye una partícula viral que incluye un polipéptido gag y pol, pero es incapaz de replicación y que carece de (i) una envoltura y/o (ii) un genoma viral (p. ej., ácido nucleico viral). En una realización específica, la VLP de la descripción es una partícula viral desnuda que comprende polipéptidos formadores de partículas (p. ej., polipéptidos gag) y puede incluir además polipéptidos pol. En otra realización, la VLP comprende polipéptidos gag y pol.

10 La descripción proporciona secuencias de polinucleótidos y polipéptidos gag-pol (SEQ ID NO: 1 (polinucleótido gag-pol) y SEQ ID NO: 2 (gag) y SEQ ID NO: 3 (pol), respectivamente). Estas secuencias gag-pol son ilustrativas y otras secuencias gag-pol, gag o pol son fácilmente identificables por un experto en la técnica que son de otros retrovirus gamma o que comparten un alto grado de identidad y funcionalidad (véase, p. ej., los números de acceso J02255, M93134, NC001819, NC_001885 y AB67261, cada uno de los cuales proporciona secuencias que comprenden polinucleótidos y polipéptidos gag y pol; las secuencias asociadas con cada número de acceso se incorporan en el presente documento).

15 La descripción proporciona composiciones inmunosupresoras que comprenden (i) una VLP que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 2 y/o 3; (ii) un polipéptido que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 2 y/o 3; (iii) una VLP que comprende o que consiste en un polipéptido que tiene al menos 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 98%, 99%, 99.5% de identidad con la SEQ ID NO: 2 y/o 3; y (iv) un polipéptido que tiene al menos 85%, 87%, 90%, 92%, 95%, 98%, 99%, 99.5% de identidad con la SEQ ID NO: 2 y/o 3 y que es inmunosupresor por inhibición de una ruta de interferón tipo 1 y/o la producción de IFN α y/o β .

20 Por "polipéptido formador de partículas" derivado de una proteína viral particular se entiende una proteína viral de longitud completa o longitud casi completa, así como un fragmento de la misma, o una proteína viral con eliminaciones internas, que tiene la capacidad de formar VLP en condiciones que favorecen la formación de VLP. Por consiguiente, el polipéptido puede comprender la secuencia de longitud completa, fragmentos, secuencias truncadas y parciales, así como análogos y formas precursoras de la molécula de referencia. Por lo tanto, el término se dirige a eliminaciones, adiciones y sustituciones en la secuencia, con la condición de que el polipéptido retenga la capacidad de formar una VLP y/o suprimir la ruta de interferón tipo I. Por lo tanto, el término incluye variaciones naturales del polipéptido especificado ya que ocurren con frecuencia variaciones en las proteínas de la cubierta entre aislados virales. El término también incluye eliminaciones, adiciones y sustituciones que no se encuentran de forma natural en la proteína de referencia, con la condición de que la proteína retenga la capacidad de formar una VLP y/o suprimir la ruta de interferón tipo I.

25 Las expresiones "poliproteína gag" o "proteína gag", "poliproteína pro" o "proteína pro", y "poliproteína pol" o "proteína pol" se refieren a las múltiples proteínas codificadas por los genes gag, pro y pol retrovirales, que se expresan típicamente como un precursor único de "poliproteína". Como se usa en el presente documento, el término "poliproteína" incluirá todas o una parte de las poliproteínas gag, pro o pol. La traducción del ARN viral ocasionalmente conduce a la síntesis de una proteína de fusión que normalmente se llama precursor de gag-pol pero ahora se llama de forma más adecuada precursor de gag-pro-pol.

30 Un "polipéptido gag" como se usa en el presente documento es el polipéptido estructural derivado de retrovirus que es responsable de la formación de las partículas similares a virus descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el polipéptido gag se puede mutar deliberadamente con el fin de afectar a ciertas características. Un genoma retroviral típico codifica tres productos génicos principales: el gen gag codifica proteínas estructurales, el gen pol codifica transcriptasa inversa y polipéptidos proteolíticos asociados, funciones asociadas con nucleasa e integrasa, y env cuyas proteínas de membrana glucoproteínas codificadas se detectan en la superficie de células infectadas y también en la superficie de partículas virales liberadas maduras. Los genes gag de todos los retrovirus tienen una similitud estructural general y dentro de cada grupo de retrovirus se conservan a nivel de aminoácidos. El gen gag da lugar a las proteínas nucleares que excluyen la transcriptasa inversa.

35 Para MLV, la poliproteína precursora de gag es Pr65^{Gag} y se escinde en cuatro proteínas cuyo orden en el precursor es NH₂-p15-pp12-p30-p10-COOH. Estas escisiones son mediadas por una proteasa viral y pueden ocurrir antes o después de la liberación viral, dependiendo del virus. La proteína gag de MLV existe en forma glucosilada y no glucosilada. Las formas glucosiladas se escinden de gPr80^{Gag}, que es sintetizada a partir de un codón de inicio en marco diferente situado en la dirección 5' del codón AUG para Pr65^{Gag} no glucosilado. Los mutantes por eliminación de MLV que no sintetizan el Gag glucosilado siguen siendo infecciosos y el Gag no glucosilado todavía puede formar partículas similares a virus.

40 Estructuralmente, la poliproteína gag prototípica se divide en tres proteínas principales que generalmente se encuentran en el mismo orden en los genes gag retrovirales: la proteína de la matriz (MA), la proteína de la cápside (CA) y la proteína de la nucleocápside (NC). El procesamiento de la poliproteína gag en las proteínas maduras es catalizado por la proteasa codificada por retrovirus y se produce a medida que maduran las partículas virales recién formadas. Funcionalmente, la poliproteína gag se divide en tres dominios: el dominio de unión a la membrana, que

dirige la poliproteína gag a la membrana celular; el dominio de interacción que promueve la polimerización de gag; y el dominio tardío que facilita la liberación de viriones que nacen de la célula hospedante. La forma de la proteína gag que media el ensamblaje es la poliproteína. El polipéptido gag como se incluye en el presente documento incluye, por lo tanto, los elementos funcionales para la formación y liberación de las VLP. Los expertos en la técnica comprenderán fácilmente los propósitos, la clonación, expresión y las secuencias asociadas con los polipéptidos y polinucleótidos gag (véase, p. ej., Hansen et al., *J. Virol.*, 64:5306-5316, 1990; Will et al., *AIDS*, 5:639-654, 1991; Wang et al., *J. Virol.*, 72:7950-7959, 1998; McDonnell et al., *J. Mol. Biol.*, 279:921-928, 1998; Schultz y Rein, *J. Virol.*, 63:2370-2372, 1989; Accola et al., *J. Virol.*, 72:2072-2078, 1998; Borsetti et al., *J. Virol.*, 72:9313-9317, 1998; Bowzard et al., *J. Virol.*, 72:9034-9044, 1998; Krishna et al., *J. Virol.*, 72:564-577, 1998; Wills et al., *J. Virol.*, 68:6605-6618, 1994; Xiang et al., *J. Virol.*, 70:5695-5700, 1996; y Garnier et al., *J. Virol.*, 73:2309-2320, 1999).

Como se usa en las VLP de la descripción, el polipéptido gag puede incluir los elementos funcionales para la formación de la VLP. El polipéptido gag puede incluir opcionalmente uno o más polipéptidos adicionales que se pueden generar por corte y empalme de la secuencia codificante para el uno o más polipéptidos adicionales en la secuencia codificante del polipéptido gag. Un sitio útil para la inserción de polipéptidos adicionales en el polipéptido gag es el extremo C.

El polipéptido pol de la descripción es conocido en la técnica. El gen pol codifica la ADN polimerasa dirigida por ARN (transcriptasa inversa), proteasa e integrasa. Se ha demostrado que la proteína pol se puede incorporar en la cápside viral sola aunque a una velocidad menor (p. ej., no como una poliproteína gag-pol sino como una proteína pol).

Los métodos para determinar el porcentaje de identidad, relación, homología y similares son conocidos en la técnica. Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más ácidos nucleicos o polinucleótidos: (a) "secuencia de referencia", (b) "ventana de comparación", (c) "identidad de secuencia", (d) "porcentaje de identidad de secuencia" y (e) "identidad sustancial".

Como se usa en el presente documento, "secuencia de referencia" es una secuencia definida que se usa como base para la comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto o la totalidad de una secuencia especificada; por ejemplo, como un segmento de una secuencia de ADNc o gen de longitud completa, o la secuencia completa de ADNc o gen.

Como se usa en el presente documento, "ventana de comparación" hace referencia a un segmento contiguo y especificado de una secuencia de polinucleótido, en donde la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. En general, la ventana de comparación tiene al menos 20 nucleótidos contiguos de longitud, y opcionalmente puede tener 30, 40, 50, 100 o más. Los expertos en la técnica entienden que para evitar una gran similitud con una secuencia de referencia debido a la inclusión de huecos en la secuencia del polinucleótido, típicamente se introduce una penalización por huecos y se resta del número de coincidencias.

Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias cualquiera se puede lograr usando un algoritmo matemático. Los ejemplos no limitantes de dichos algoritmos matemáticos son el algoritmo de Myers y Miller (Myers y Miller, *CABIOS*, 4, 11 (1988)); el algoritmo de homología local de Smith et al. (Smith et al., *Adv. Appl. Math.*, 2, 482 (1981)); el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch, *JMB*, 48, 443 (1970)); el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 2444 (1988)); el algoritmo de Karlin y Altschul (Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 2264 (1990)), modificado como en Karlin y Altschul (Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5873 (1993)).

Las implementaciones informáticas de estos algoritmos matemáticos se pueden usar para la comparación de secuencias para determinar la identidad de secuencia. Dichas implementaciones incluyen, pero no se limitan a: CLUSTAL en el programa PC/Gene (disponible en Intelligenetics, Mountain View, California); el programa ALIGN (versión 2.0) y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, versión 8 (disponible en Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE. UU.). Los alineamientos que usan estos programas se pueden llevar a cabo usando los parámetros predeterminados. El programa CLUSTAL está bien descrito por Higgins et al. (Higgins et al., *CABIOS*, 5, 151 (1989)); Corpet et al. (Corpet et al., *Nucl. Acids Res.*, 16, 10881 (1988)); Huang et al. (Huang et al., *CABIOS*, 8, 155 (1992)); y Pearson et al. (Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.*, 24, 307 (1994)). El programa ALIGN se basa en el algoritmo de Myers y Miller, véase antes. Los programas BLAST de Altschul et al. (Altschul et al., *JMB*, 215, 403 (1990)) se basan en el algoritmo de Karlin y Altschul, véase antes.

El software para llevar a cabo el análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias con puntuación alta (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud "W" en la secuencia de consulta, que o bien coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. "T" se conoce como el umbral de puntuación de palabras vecinas.

Estas coincidencias iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largas que las contengan. Después, las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta que se pueda aumentar la puntuación de alineamiento acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros "M" (puntuación de recompensa por un par de restos coincidentes; siempre > 0) y "N" (puntuación de penalización por restos no coincidentes; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando la puntuación de alineamiento acumulativa cae en la cantidad "X" de su valor máximo alcanzado, la puntuación acumulativa va a cero o menos debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa, o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias.

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que se produzca una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de prueba se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación de la secuencia de ácido nucleico de prueba con la secuencia de ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0.1, menor que aproximadamente 0.01, o incluso menor que aproximadamente 0.001.

Para obtener alineamientos con huecos con fines de comparación, se puede usar Gapped BLAST (en BLAST 2.0). Alternativamente, PSI-BLAST (en BLAST 2.0) se puede usar para realizar una búsqueda iterativa que detecta relaciones distantes entre moléculas. Cuando se usa BLAST, Gapped BLAST, PSI-BLAST, se pueden usar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (p. ej., BLASTN para secuencias de nucleótidos, BLASTX para proteínas). El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, un límite de 100, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62. El alineamiento también se puede realizar manualmente mediante inspección.

Para los fines de la descripción, la comparación de secuencias de nucleótidos para determinar el porcentaje de identidad de secuencia con las secuencias promotoras descritas en el presente documento se puede hacer usando el programa BlastN (versión 1.4.7 o posterior) con sus parámetros predeterminados o cualquier programa equivalente. Por "programa equivalente" se entiende cualquier programa de comparación de secuencias que, para cualesquiera dos secuencias en cuestión, genera un alineamiento que tiene coincidencias idénticas de nucleótidos o restos de aminoácidos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico cuando se compara con el alineamiento correspondiente generado por el programa.

Como se usa en el presente documento, "identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido hace referencia a un porcentaje específico de restos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una correspondencia máxima a lo largo de una ventana de comparación específica, medida por algoritmos de comparación de secuencias o por inspección visual. Cuando se usa el porcentaje de identidad de secuencia en referencia a proteínas, se reconoce que las posiciones de los restos que no son idénticas a menudo difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos, donde los restos de aminoácidos se sustituyen por otros restos de aminoácidos con propiedades químicas similares (p. ej., carga o hidrofobicidad) y, por lo tanto, no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia se puede ajustar hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Se dice que las secuencias que difieren en tales sustituciones conservadoras tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los expertos en la materia. Típicamente, esto implica puntuar una sustitución conservadora como un mal apareamiento parcial en lugar de uno completo, aumentando así el porcentaje de identidad de secuencia. Por lo tanto, por ejemplo, cuando a un aminoácido idéntico se le da una puntuación de 1 y a una sustitución no conservadora se le da una puntuación de cero, a una sustitución conservadora se le da una puntuación entre cero y 1. Se calcula la puntuación de las sustituciones conservadoras, p. ej., como se implementa en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

Como se usa en el presente documento, "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado comparando dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de una ventana de comparación, en donde la parte de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que se encuentra la misma base de ácido nucleico o resto de aminoácido en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

La expresión "identidad sustancial" de secuencias de polinucleótidos significa que un polinucleótido comprende una

secuencia que tiene al menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% o 94%, o incluso al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia, en comparación con una secuencia de referencia (p. ej., SEQ ID NO: 1) usando uno de los programas de alineamiento descritos usando parámetros estándar. Un experto en la materia reconocerá que estos valores se pueden ajustar adecuadamente para determinar la identidad correspondiente de proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de codones, la similitud de aminoácidos, el posicionamiento del marco de lectura y similares. La identidad sustancial de las secuencias de aminoácidos para estos fines normalmente significa una identidad de secuencia de al menos el 70%, 80%, 90% o incluso al menos 95%.

Otra indicación de que las secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas es si dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C menos que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones rigurosas abarcan temperaturas en el intervalo de aproximadamente 1°C a aproximadamente 20°C, dependiendo del grado de rigurosidad deseado como se califica por otra parte en el presente documento. Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones rigurosas siguen siendo sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto puede ocurrir, p. ej., cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético. Una indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es cuando el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico tiene reactividad cruzada inmunológica con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico.

La expresión "identidad sustancial" en el contexto de un péptido indica que un péptido comprende una secuencia con al menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93% o 94% , o incluso 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación especificada. En ciertas realizaciones, el alineamiento óptimo se lleva a cabo usando el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch, *JMB*, 48, 443 (1970)). Una indicación de que dos secuencias de péptidos son sustancialmente idénticas es que un péptido es inmunológicamente reactivo con anticuerpos generados contra el segundo péptido. Por lo tanto, un péptido es sustancialmente idéntico a un segundo péptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solo por una sustitución conservadora. Por lo tanto, la invención también proporciona moléculas de ácido nucleico y péptidos que son sustancialmente idénticos a las moléculas de ácido nucleico y péptidos presentados en el presente documento.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. Después, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la o las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, en función de los parámetros de programa designados.

Como se ha indicado antes, otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas. La frase "que hibridan específicamente con" se refiere a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula solo con una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (p. ej., celular total) de ADN o ARN. "Se une(n) sustancialmente" se refiere a la hibridación complementaria entre un ácido nucleico sonda y un ácido nucleico diana y abarca apareamientos erróneos poco importantes que se pueden acomodar reduciendo la rigurosidad de los medios de hibridación para lograr la detección deseada de la secuencia de ácido nucleico diana.

Las "condiciones de hibridación rigurosas" y las "condiciones de lavado de hibridación rigurosas" en el contexto de experimentos de hibridación de ácidos nucleicos tales como las hibridaciones Southern y Northern dependen de la secuencia, y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. El punto de fusión térmico (T_m) es la temperatura (a la fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente apareada. La especificidad es típicamente función de los lavados posteriores a la hibridación, siendo los factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para los híbridos de ADN-ADN, la T_m puede aproximarse a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl (1984); T_m 81.5°C +16.6 (log M) +0.41 (% GC) -0.61 (% form.) -500/L; donde M es la molaridad de los cationes monovalentes, % GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, % form. es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación, y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_m se reduce en aproximadamente 1°C por cada 1% de apareamiento erróneo; por lo tanto, la T_m, hibridación y/o condiciones de lavado se pueden ajustar para hibridar con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con identidad > 90%, la T_m se puede disminuir 10°C. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C más bajas que la T_m para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y pH definidos. Sin embargo, las condiciones muy rigurosas pueden usar una hibridación y/o lavado a 1, 2, 3 o 4°C menos que la T_m; las condiciones moderadamente rigurosas pueden usar una hibridación y/o lavado a 6, 7, 8, 9 o 10°C menos que la T_m; las condiciones de baja rigurosidad pueden usar una

hibridación y/o lavado a 11, 12, 13, 14, 15 o 20°C menos que la T_m . Usando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado, y la temperatura deseada, los expertos en la materia entenderán que las variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado se describen inherentemente. Si el grado deseado de apareamiento erróneo produce una temperatura de menos de 45°C (solución acuosa) o 32°C (solución de formamida), la concentración de SSC se aumenta para que se pueda usar una temperatura más alta. En general, las condiciones de hibridación y lavado altamente rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C menos que la T_m para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos.

Un ejemplo de condiciones de lavado altamente rigurosas es NaCl 0.15 M a 72°C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado de 0.2xSSC a 65°C durante 15 minutos. A menudo, un lavado de alta rigurosidad está precedido por un lavado de baja rigurosidad para eliminar la señal de la sonda de fondo. Un ejemplo de lavado de rigurosidad media para un dúplex de, p. ej., más de 100 nucleótidos, es 1xSSC a 45°C durante 15 minutos. Para secuencias de nucleótidos cortas (p. ej., de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos), las condiciones rigurosas típicamente implican concentraciones de sal de menos de aproximadamente 1.5 M, menos de aproximadamente 0.01 a 1.0 M, concentración de iones de Na (u otras sales) a pH de 7.0 a 8.3, y la temperatura es típicamente al menos aproximadamente 30°C y al menos aproximadamente 60°C para sondas largas (p. ej. >50 nucleótidos). También se pueden lograr condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizadores tales como la formamida. En general, una relación de señal a ruido de 2x (o superior) que la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica la detección de una hibridación específica. Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones rigurosas siguen siendo sustancialmente idénticos si las proteínas que codifican son sustancialmente idénticas. Esto ocurre, p. ej., cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético.

Se seleccionan condiciones muy rigurosas para que sean iguales a la T_m para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 restos complementarios sobre un filtro en una transferencia Southern o Northern es formamida al 50%, p. ej., hibridación en formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 0.1xSSC de 60 a 65°C. Las condiciones de rigurosidad baja de ejemplo incluyen hibridación con una solución tampón de formamida del 30 al 35%, NaCl 1 M, SDS (dodecilsulfato de sodio) al 1% a 37°C y un lavado en 1x a 2xSSC (20xSSC = NaCl 3.0 M/ citrato trisódico 0.3 M) de 50 a 55°C. Las condiciones de rigurosidad moderada de ejemplo incluyen hibridación en formamida del 40 al 45%, NaCl 1.0 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 0.5x a 1xSSC de 55 a 60°C.

La descripción proporciona composiciones que comprenden una composición derivada de gammaretrovirus que no es capaz de replicación y que suprime la producción de IFN y/o suprime una ruta de IFN tipo I. Se describe en el presente documento, que la composición comprende una partícula similar a virus que comprende o que consiste en un polipéptido gag y pol de un gammaretrovirus tal como MLV. También se describe en el presente documento, que la VLP consiste en una partícula viral y un polipéptido gag y pol. En otra realización, la composición comprende polipéptido gag y pol de un gammaretrovirus.

Las composiciones de la descripción son para usar en el tratamiento de trastornos inmunitarios. Como se usa en el presente documento, la expresión "trastorno inmunitario" y expresiones similares significa una enfermedad, trastorno o afección causada por el sistema inmunitario de un animal, incluyendo trastornos autoinmunitarios. Los trastornos inmunitarios incluyen aquellas enfermedades, trastornos o afecciones que tienen un componente inmunitario y aquellas que son mediadas sustancial o totalmente por el sistema inmunitario. En una realización, la enfermedad o trastorno inmunitario es una enfermedad o trastorno inmunitario mediado por interferón tipo I. En otra realización, la enfermedad o trastorno inmunitario está asociado con IFN α . Los trastornos autoinmunitarios son aquellos en los que el sistema inmunitario del propio individuo se ataca por error a sí mismo, dirigiéndose así a las células, tejidos y/u órganos del propio cuerpo del individuo. Por ejemplo, la reacción autoinmunitaria está dirigida contra el sistema nervioso en la esclerosis múltiple y el intestino en la enfermedad de Crohn. En otros trastornos autoinmunitarios como el lupus eritematoso sistémico (lupus), los tejidos y órganos afectados pueden variar entre los individuos con la misma enfermedad. Una persona con lupus puede tener afectada la piel y las articulaciones, mientras que otra puede tener afectada la piel, riñones y pulmones. Finalmente, el daño a ciertos tejidos por el sistema inmunitario puede ser permanente, como en la destrucción de las células productoras de insulina del páncreas en la diabetes mellitus tipo 1. Los trastornos autoinmunitarios específicos que pueden mejorar usando los compuestos y métodos de esta invención incluyen, sin limitación, trastornos autoinmunitarios del sistema nervioso (p. ej., esclerosis múltiple, miastenia grave, neuropatías autoinmunitarias como Guillain-Barré y uveítis autoinmunitaria), trastornos autoinmunitarios de la sangre (p. ej., anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia perniciosa y trombocitopenia autoinmunitaria), trastornos autoinmunitarios de los vasos sanguíneos (p. ej., arteritis temporal, síndrome antifosfolípido, vasculitis tal como la granulomatosis de Wegener y la enfermedad de Behcet), trastornos autoinmunitarios de la piel (p. ej., psoriasis, dermatitis herpetiforme, pénfigo vulgar y vitiligo), trastornos autoinmunitarios del sistema gastrointestinal (p. ej., enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, cirrosis biliar primaria y hepatitis autoinmunitaria), trastornos autoinmunitarios de las glándulas endocrinas (p. ej., diabetes mellitus tipo 1 o inmunomediada, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, ooforitis y orquitis autoinmunitarias y trastorno autoinmunitario de la glándula suprarrenal); y trastornos autoinmunitarios de múltiples órganos (incluyendo enfermedades del tejido conectivo y del sistema musculoesquelético) (p. ej., artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerodermia, polimiositis, dermatomiositis, espondiloartropatías tales como espondilitis anquilosante y síndrome de Sjogren). Además, otras enfermedades mediadas por el sistema inmunitario, como la enfermedad de

injerto contra huésped y los trastornos alérgicos, también se incluyen en la definición de trastornos autoinmunitarios en el presente documento. Debido a que una serie de trastornos autoinmunitarios son causados por inflamación, existe cierta superposición entre los trastornos que se consideran trastornos autoinmunitarios y los trastornos inflamatorios. Para los fines de esta descripción, en el caso de dicho trastorno superpuesto, se puede considerar un trastorno inmunitario o un trastorno inflamatorio. "Tratamiento de un trastorno inmunitario" en el presente documento se refiere a la administración de un compuesto o una composición de la descripción a un sujeto, que tiene un trastorno inmunitario, un síntoma de dicha enfermedad o una predisposición hacia dicha enfermedad, con el fin de curar, aliviar, alterar, afectar o prevenir el trastorno autoinmunitario, su síntoma o la predisposición al mismo.

Se describe en el presente documento que los compuestos de esta descripción son para usar en el tratamiento o prevención de trastornos inflamatorios. Como se usa en el presente documento, un "trastorno inflamatorio" significa una enfermedad, trastorno o afección caracterizada por inflamación del tejido corporal o que tiene un componente inflamatorio. Estos incluyen respuestas inflamatorias locales e inflamación sistémica. Los ejemplos de dichos trastornos inflamatorios incluyen: rechazo de trasplante, incluyendo rechazo de injerto de piel; trastornos inflamatorios crónicos de las articulaciones, incluyendo artritis, artritis reumatoide, osteoartritis y enfermedades óseas asociadas con un aumento de la resorción ósea; enfermedades inflamatorias del intestino tales como ileítis, colitis ulcerosa, síndrome de Barrett y enfermedad de Crohn; trastornos inflamatorios pulmonares tales como asma, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, y enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias; trastornos inflamatorios del ojo que incluyen distrofia corneal, tracoma, oncocercosis, uveítis, oftalmía simpática y endoftalmítis; trastornos inflamatorios crónicos de las encías, que incluyen gingivitis y periodontitis; tuberculosis; lepra; enfermedades inflamatorias del riñón, que incluyen complicaciones urémicas, glomerulonefritis y nefrosis; trastornos inflamatorios de la piel que incluyen esclerodermatitis, psoriasis y eczema; enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central, que incluyen enfermedades crónicas desmielinizantes del sistema nervioso, esclerosis múltiple, neurodegeneración relacionada con el SIDA y enfermedad de Alzheimer, meningitis infecciosa, encefalomielitís, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y encefalitis viral o autoinmune; trastornos autoinmunitarios, vasculitis inmunocompleja, lupus sistémico y eritematodos; lupus eritematoso sistémico (LES); y enfermedades inflamatorias del corazón tales como cardiomiopatía, enfermedad cardiaca isquémica hipercolesterolemia, aterosclerosis); así como varias otras enfermedades con componentes inflamatorios significativos, incluyendo preeclampsia; insuficiencia hepática crónica, traumatismo cerebral y de la médula espinal, cáncer). También puede haber una inflamación sistémica del cuerpo, ilustrada por choque por Gram positivo o Gram negativo, choque hemorrágico o anafiláctico, o choque inducido por quimioterapia del cáncer en respuesta a citoquinas proinflamatorias, p. ej., choque asociado con citoquinas proinflamatorias. Dicho choque puede ser inducido, p. ej., por un agente quimioterapéutico usado en la quimioterapia del cáncer.

El "tratamiento de un trastorno inflamatorio" en el presente documento se refiere a la administración de un compuesto o una composición de la invención a un sujeto, que tiene un trastorno inflamatorio, un síntoma de dicho trastorno o una predisposición hacia dicho trastorno, con el fin de curar, aliviar, alterar, afectar o prevenir el trastorno inflamatorio, el síntoma del mismo o la predisposición al mismo.

Los métodos para la inmunosupresión o para tratar o prevenir afecciones inflamatorias y trastornos inmunitarios en un paciente que lo necesite pueden comprender además administrar al paciente al que se va a administrar una composición de esta descripción (p. ej., una composición que comprende una VLP, partícula viral que contiene polipéptidos gag-pol, y similares, en intervalos que van desde 10 ng de proteína p30 si se administra localmente, hasta 1 g si se administra por vía intravenosa; también se pueden usar dosis intermedias dependiendo de la indicación que se va a tratar, el propósito del tratamiento y/o la ruta de administración, véase más adelante), y puede incluir además una cantidad eficaz de uno o más de otros agentes activos. Dichos agentes activos pueden incluir aquellos los de forma convencional para inmunosupresión o para afecciones inflamatorias o trastornos inmunitarios. Estos otros agentes activos también pueden ser los que proporcionan otros beneficios cuando se administran en combinación con las composiciones de la descripción. Por ejemplo, otros agentes terapéuticos pueden incluir, sin limitación, esteroides, agentes antiinflamatorios no esteroideos, antihistamínicos, analgésicos, agentes inmunosupresores y mezclas adecuadas de los mismos. En dicho tratamiento de terapia de combinación, tanto la composición de esta descripción como el o los otros agentes farmacológicos se administran a un sujeto (p. ej., un mamífero, ser humano, etc., hombre o mujer) por métodos convencionales. Los agentes se pueden administrar en una forma farmacéutica única o en formas farmacéuticas separadas. Los expertos en la técnica conocen bien las cantidades eficaces de los otros agentes terapéuticos y formas farmacéuticas. Está dentro de la competencia del experto en la técnica determinar el intervalo de la cantidad eficaz óptima del otro agente terapéutico.

Cuando se administra otro agente terapéutico a un sujeto, la cantidad eficaz de la composición de la descripción es menor que su cantidad eficaz cuando no se administra el otro agente terapéutico. Se describe en el presente documento, que la cantidad eficaz del agente convencional es menor que su cantidad eficaz cuando no se administra la composición de la descripción. De esta manera, se pueden minimizar los efectos secundarios no deseados asociados con dosis altas de cualquiera de los agentes. Otras ventajas potenciales (que incluyen, sin limitación, pautas posológicas mejoradas y/o menor coste de fármaco) serán evidentes para los expertos en la técnica.

Se describe en este documento, en relación con afecciones autoinmunitarias e inflamatorias, que el otro agente terapéutico puede ser un agente antiinflamatorio esteroideo o no esteroideo. Los agentes antiinflamatorios no

5 esteroideos particularmente útiles incluyen, pero no se limitan a aspirina, ibuprofeno, diclofenaco, naproxeno, benoxaprofeno, flurbiprofeno, fenoprofeno, flubufeno, ketoprofeno, indoprofeno, piroprofeno, carprofeno, oxaprozina, pramoprofeno, muroprofeno, trioxaprofeno, suprofen, aminoprofeno, ácido tiaprofénico, fluprofeno, ácido buclóxico, indometacina, sulindaco, tolmetina, zomepirac, tiopinac, zidometacina, acemetacina, fentiazac, clidanac, oxpinac, ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenálico, ácido niflúmico, ácido tolfenámico, diflusal, flufenisal, piroxicam, sudoxicam, isoxicam; derivados del ácido salicílico, que incluyen aspirina, salicilato de sodio, colina trisalicilato de magnesio, salsalato, diflunisal, ácido salicilsalicílico, sulfasalazina y olsalazina; derivados de para-aminofenol, que incluyen acetaminofeno y fenacetina; indol y ácidos indeno-acéticos, que incluyen indometacina, sulindaco y etodolaco; ácidos heteroarilacéticos, que incluyen tolmetina, diclofenaco y ketorolaco; ácidos antranílicos (fenamatos), que incluyen ácido mefenámico y ácido meclofenámico; ácidos enólicos, que incluyen oxicams (piroxicam, tenoxicam) y pirazolidinadionas (fenilbutazona, oxifentartazona); y alcanonas, que incluyen nabumetona y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y mezclas de los mismos. Para una descripción más detallada de los AINE, véase Paul A. Insel, Analgesic-Antipyretic and Antiinflammatory Agents and Drugs Employed in the Treatment of Gout, en Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 617-57 (Perry B. Molinoff y Raymond W. Ruddon eds., 9ª ed. 1996) y Glen R. Hanson, Analgesic, Antipyretic and Anti-Inflammatory Drugs en Remington: The Science and Practice of Pharmacy Vol II 1196-1221 (A. R. Gennaro ed. 19ª ed. 1995).

20 Los agentes inmunosupresores incluyen glucocorticoides, corticosteroides (tales como prednisona o solumedrol), bloqueadores de células T (tales como ciclosporina A y FK506), análogos de purina (tales como azatioprina (Imuran)), análogos de pirimidina (tales como arabinósido de citosina), agentes alquilantes (tales como mostaza nitrogenada, mostaza de fenilalanina, busfan y ciclofosfamida), antagonistas del ácido fólico (tales como aminopterina y metotrexato), antibióticos (tales como rapamicina, actinomicina D, mitomicina C, puramicina y cloranfenicol), IgG humana, antiglobulina de linfocito (ALG) y anticuerpos (tales como anti-CD3 (OKT3), anti-CD4 (OKT4), anti-CD5, anti-CD7, receptor anti-IL-2, anti-alfa/beta TCR, anti-ICAM-1, anti-CD20 (Rituxan), anti-IL-12 y anticuerpos contra inmunotoxinas).

25 Las terapias de combinación anteriores y otras útiles serán entendidas y apreciadas por los expertos en la técnica. Las ventajas potenciales de dichas terapias de combinación incluyen un perfil de eficacia diferente, la capacidad de usar menos de cada uno de los ingredientes activos individuales para minimizar los efectos secundarios tóxicos, mejoras sinérgicas en la eficacia, facilidad de administración o uso mejorada y/o gastos generales reducidos de la preparación del compuesto o formulación.

30 En una realización, una VLP de la descripción se puede administrar en combinación con una composición esteroidea. Se describe en el presente documento, que la VLP sola o en combinación con un esteroide se puede administrar a un sujeto antes de la administración de un vector viral de terapia génica o suministro génico. Se describe en el presente documento, que la VLP sola o en combinación con un esteroide u otra composición inmunosupresora se administra antes del suministro de Toca 511 (véase, Patente de EE. UU. N° 8 722 867, De esta manera se suprime la respuesta inmunitaria contra Toca 511.

35 La expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de un ingrediente activo de una composición de la descripción (p. ej., una VLP) eficaz para tratar (incluyendo prevención) una enfermedad, trastorno o afecciones fisiológicas no deseadas en un mamífero (p. ej., activación de la ruta del interferón tipo I, producción de IFN α , etc.). En la descripción, una "cantidad eficaz" de una composición de la descripción puede reducir, ralentizar o retrasar un trastorno autoinmunitario tal como IDDM o SLE; reducir, prevenir o inhibir (es decir, retrasar hasta cierto punto y preferiblemente detener) el desarrollo de un trastorno autoinmunitario tal como IDDM o SLE; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con trastornos autoinmunitarios como IDDM o SLE.

40 En los métodos de la descripción, el término "control" y sus variantes gramaticales se usan para referirse a la prevención, inhibición parcial o completa, reducción, retraso o desaceleración de un suceso no deseado, p. ej., una afección fisiológica, tal como la generación de células T autorreactivas y el desarrollo de autoinmunidad.

45 El "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se va a prevenir el trastorno. Para los fines de esta descripción, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, no empeora), retraso o desaceleración del avance, mejora o paliación del estado de la enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable.

50 El "tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen la afección o trastorno, así como aquellos propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que se debe prevenir la afección o trastorno.

55 Los vehículos, excipientes o estabilizantes "farmacéuticamente aceptables" son aquellos que no son tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a los mismos en las dosis y concentraciones usadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente

aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS.

"Mamífero" para los fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Típicamente, el mamífero es un ser humano.

La descripción proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la expresión de IFN- α en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de una composición derivada de VLP o gammaretrovirus que es inmunosupresora. La administración puede incluir agentes inmunosupresores adicionales tales como, p. ej., un anticuerpo anti-IFN- α . El paciente es un paciente mamífero, típicamente un paciente humano. La enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria, tal como la diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM); lupus eritematoso sistémico (LES); o tiroiditis autoinmune.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no limitar la descripción. Aunque son típicos de los que se podrían usar, se pueden usar alternativamente otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplos

20 Materiales. Las siguientes líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC): células de fibrosarcoma humano (HT1080); células de astrocitoma humano U87-MG (HTB-14); células de adenocarcinoma de próstata humano PC3 (CRL-1435); células de carcinoma de próstata humano, LN-CaP (CRL-1740); linfocitos T humanos Sup-T1 (CRL-1942); líneas celulares de fibroblastos humanos WI-38 (CCL-75) y CCD-1070Sk (CRL-2091) y células caninas derivadas de timo fetal normal Cf2Th (CRL-1430). Las HUVEC primarias se obtuvieron de Vec
25 Technologies. Las células 293T se obtuvieron a través de fuentes no comerciales. Las células 293GP, que expresan niveles altos de gag y pol de MLV de Moloney como se describe en Friedmann et al. (*Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8033-8037, 1993). Las células 293GP/pBA9b, que contienen un provirus pBA9b integrado, se obtienen de células 239GP que se transdujeron con vector de MLV pseudotipado con VSV-G.

30 Cultivo celular. Las células 293T, 293GP, 293GP/pBA9b, HT1080, U87-MG, PC3 y Cf2Th se cultivaron en medio DMEM completo que contenía FBS al 10% (Hyclone), piruvato de sodio, glutamax y penicilina/estreptomina y antibióticos (penicilina 100 UI/ml, estreptomina 50 μ g/ml). Las células LN-CaP y Sup-T1 se cultivaron en medio RPMI completo que contenía FBS al 10%, Glutamax y penicilina/estreptomina. Las células WI-38 se cultivaron en MEM que contenía FBS al 10%, Glutamax y penicilina/estreptomina. Las HUVEC primarias se cultivaron en medio MCDB-131C (VecTechnologies).

35 Experimentos en los que las células U87-MG se trataron con IFN tipo I exógeno, IFN α 2a recombinante o IFN β recombinante (PBL Interferon Source, producto n° 11100-1 y 11415-1, respectivamente) en 200 U/ml. Las citoquinas se aplicaron al medio de cultivo durante el tiempo de la infección inicial y en el tiempo de cada pase celular (cada dos días). La selección de células U87-MG resistentes a IFN α e IFN β se llevó a cabo sembrando células U87-MG
40 parentales en placas de 12 pocillos. Las células se seleccionaron en presencia de una alta concentración (1000 U/ml) de IFN α o IFN β exógeno en cultivo durante aproximadamente 21 días. Después de una selección de 21 días en cultivo, las células se recuperaron y se expandieron en ausencia de IFN α/β .

Los experimentos en los que las células U87-MG se trataron con poli(I:C), las células se sembraron el día antes de la transfección con 1×10^5 células por pocillo en placas de 12 pocillos. Después, las células se transfectaron con 10 μ g de poli(I:C) (Sigma, cat n° P0913) usando el reactivo de transfección HD FuGene HD (Roche, cat n° 04709691001). Aproximadamente 8 horas después de la transfección, se recogió el líquido sobrenadante para un
45 ensayo ligado a enzimas tipo sándwich (ELISA, PBL Interferon Source) con el fin de cuantificar la cantidad de IFN α e IFN β .

Producción de vectores basada en MLV. Toca 511 y RRV-GFP son RRV basados en MLV de Moloney con un gen de envoltura anfotrópico y un casete de transgén de IRES de EMCV en la dirección 3' del gen *env* (p. ej., véase Perez OD, et al. *Mol Ther* 20 (9): 1689-1698 (2012); Patentes de EE. UU. N° 6 410 313, 8 652 460, 8 722 867 y 8 741 279, que describen la secuencia y estructura del vector, métodos de fabricación, uso e infectividad). El plásmido pBA9b es un vector retroviral de replicación defectuosa basado en MLV (p. ej., véase Sheridan PL, et al. *Mol Ther* 2 (3): 262-275 (2000)). También se usaron vectores de expresión que codifican *gag-pol* de MLV, gen de envoltura anfotrópico y gen de VSV-G. Se generaron cepas de virus de RRV-GFP y Toca 511 a partir de líneas celulares productoras humanas estables, seguido de purificación en columna. Las cepas de virus de Toca 511 pseudotipados con glucoproteína-G del vector del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), vector retroviral basado en MLV de replicación defectuosa pseudotipado con proteína de envoltura anfotrópica 4070A (MLV-A), vector retroviral pseudotipado con VSV-G (MLV-G), y el vector retroviral pseudotipado con proteína de envoltura anfotrópica (MLV-
55

A+G), (indicado como Toca511-G, MLV-A, MLV-G y MLV-A+G, respectivamente) se produjeron por transfección transitoria en células 293T sembradas con 2×10^5 células por cm^2 . Las células se transfectaron con ADN plasmídico (pAC3-yCD2 y CMV-VSVG para Toca 511-G, CMV-gag-pol, pBA9b, CMV-ampho para MLV-A, CMV-gag-pol, pBA9b, CMV-VSVG para MLV- G, y CMV-gag-pol, pBA9b, CMV-ampho y CMV-VSVG para MLV-A+G) 20 horas después de la siembra celular usando un método de fosfato de calcio. Dieciocho horas después de la transfección, las células se lavaron con PBS dos veces y se incubaron con medio completo de nueva aportación. El líquido sobrenadante viral se recogió aproximadamente 42 horas después de la transfección y se filtró a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$. El líquido sobrenadante viral filtrado se sometió a tratamiento con benzonasa (Sigma) con 5 U/ml a 4°C durante la noche para así eliminar cualquier contaminación de ADN plasmídico (que podría estimular las respuestas de TLR9), seguido de centrifugación a 18 000 rpm durante 250 min. Para las partículas virales Toca511-G y MLV-A +G, se llevó a cabo purificación por centrifugación a alta velocidad con una almohadilla de sacarosa para eliminar las glucoproteínas virales no incorporadas. Todas las partículas virales concentradas se suspendieron en tampón de formulación.

Los títulos virales de RRV se determinaron como se describe en Perez OD, et al., *Mol Ther* 20 (9): 1689-1698 (2012). Brevemente, las preparaciones de vectores se titularon en células PC3 mediante infección de ciclo único de una serie de diluciones del vector. La infección de ciclo único se proporcionó mediante tratamiento con AZT, seguido de qPCR de ADN genómico de células diana específico para vector viral integrado para cuantificar el número de provirus integrados. El título viral dado en la unidad de transducción por mililitro (TU/ml) se determinó calculando los valores de Ct derivados de una curva patrón que varía de 1×10^5 copias a 1×10^1 copias de ADN plasmídico y de una cantidad conocida de introducción de ADN genómico, número de células y factor de dilución de la cepa viral por reacción usada en cada reacción.

Las VLP producidas en este estudio son partículas similares a virus que carecen de glucoproteína de envoltura y ARN viral o partículas similares a virus que carecen de glucoproteína de envoltura, pero empaquetadas con ARN viral pBA9b (VLP/pBA9b). El líquido sobrenadante de >95% confluyente de 293GP que expresa niveles altos de gag y pol de MLV de Moloney (Sharma et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 10803-10808, 1997), o células 293GP/pBA9b que se transdujeron con vector MLV pseudotipado con VSV-G con una MOI de 50, se recogió y se filtró a través de un filtro de $0.45 \mu\text{m}$ seguido de centrifugación a $19\,500 \times g$ durante 30 minutos a 4°C . Todas las partículas virales concentradas se suspendieron en tampón de formulación.

Producción de VLP nucleares. Las partículas de VLP nucleares se producen por dos métodos. A) Las VLP envueltas preparadas como se ha descrito antes se tratan con detergente diluido para disolver la membrana sin afectar a las partículas de proteína del núcleo gagpol. Alternativamente, el núcleo de VLP se puede hacer sintetizando la proteína gag de MLV de forma sintética o en bacterias y permitiendo el autoensamblaje de partículas VLP nucleares (Morikawa, citado antes). La actividad se puede confirmar mediante pruebas con células dendríticas plasmacitoides como se describe a continuación y en las figuras.

Producción de vectores lentivirales. El vector lentiviral basado en HIV-1 que codifica GFP y pseudotipado con VSV-G (LV-G) se produjo por transfección transitoria en células 293T como se ha descrito previamente en Dull T, et al., *J Virol* 72 (11): 8463-8471 (1998). El líquido sobrenadante viral se recogió 36 horas después de la transfección seguido de tratamiento con benzonasa con 5 U/ml durante la noche a 4°C . Posteriormente, el líquido sobrenadante viral se concentró por ultracentrifugación y se concentró. La cepa viral se volvió a suspender en tampón de formulación como se describe en Ostertag D, et al., *Neuro Oncol* 14 (2): 145-159 (2012). El ensayo de título viral se llevó a cabo por transducción de células 293T con una dilución en serie 1:10 a partir de la cepa viral concentrada en un volumen total de 1 ml. Las células se cosecharon 48 horas después de la transducción y se analizaron por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células positivas para GFP. El título viral dado como TU/ml se determinó por (% de células positivas para GFP x número de células sembradas x factor de dilución).

Replicación viral controlada por expresión de GFP. Para controlar la replicación viral en HT1080, U87-MG, LN-CaP, Sup-T1, WI-38 y células endoteliales de vena umbilical humana primaria (HUVEC), se infectaron 2×10^5 células en matraz T25 con RRV-GFP con una MOI de 0.01. Cada 3-4 días, una parte de las células se pasaron con medio de cultivo de nueva aportación para el control continuo de la replicación viral, y se recogió una parte de las células para determinar la expresión de GFP por citometría de flujo. Las células recogidas para la citometría de flujo se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. Los sedimentos celulares se volvieron a suspender en PBS que contenía paraformaldehído al 1%. El porcentaje de células positivas para GFP se determinó por citometría de flujo usando una activación adecuada para excluir las células negativas para GFP. El porcentaje de células positivas para GFP se midió mediante Canton II usando el canal FL1 (BD Biosciences). La cinética de replicación viral se obtuvo por representación gráfica del porcentaje de células positivas para GFP a lo largo del tiempo.

Ensayo de internalización de partículas virales. La misma cantidad de partículas virales (Toca 511 y VLP) usadas para el bioensayo de pDC se marcaron con CFDA-SE usando el kit Vybrant SFDA-SE Cell Tracer (Molecular Probes). Las VLP marcadas se dializaron frente a PBS durante la noche a 4°C y se añadieron a pDC. La CFSE conjugada fluorescente intracelular en los tiempos de medición indicados se detecta mediante citometría de flujo usando el canal FL-1.

Tratamiento con desglucosidasas, tripsina y fosfolipasa C de partículas virales. Se trató toca 511 con

desglucosidasas según el protocolo del fabricante (Promega cat n° V493A), con tripsina con 40 µg/ml (Sigma-Aldrich cat n° T1426) o con fosfolipasa C (PLC) con 50 µg/ml (Sigma-Aldrich, cat. n° P8804) en un volumen total de 50 µl. Todas las reacciones se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Al final de la incubación, se añadió 1 ml de PBS a cada muestra seguido de centrifugación a 19 500 x g durante 30 minutos a 4°C. Las muestras se volvieron a suspender en 20 µl de PBS para inmunotransferencia o bioensayo de pDC.

Expresión relativa de ARN celular por qRT-PCR. Se extrajo el ARN de las células usando el kit RNeasy con tratamiento con DNasa I (Qiagen). La transcripción inversa se llevó a cabo con 100 ng de ARN total usando el kit de transcripción inversa de ADnc de alta capacidad (ABI). La PCR cuantitativa (qPCR) se llevó a cabo usando TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (ABI, P/N n° 4324018) y cebadores de expresión génica Taqman (ABI), (ID n° Hs00169345_m1 para EIF2AK2/PKR, Hs00222415_m1 para APOBEC3G y Hs99999905_m1 para GAPDH) según el protocolo del fabricante. La expresión relativa de cada gen se expresa como $2^{-\Delta\Delta(Ct)}$ (véase applybiosystems.com)

Ensayo de expresión de matriz de PCR. Se extrajo el ARN de las células usando el kit RNeasy con tratamiento con DNasa I (Qiagen). La transcripción inversa se llevó a cabo usando el kit First Strand cDNA Synthesis (Qiagen). Las reacciones de qPCR para la ruta de respuesta de IFN α / β humano por RT² profiler PCR array (Qiagen cat n° PAHS-016D) se configuraron usando RT2 SYBR Green Master Mix y se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos del fabricante (Qiagen). El análisis de datos, el diagrama de dispersión, datos de regulación de cada estudio experimental se obtuvieron usando un software basado en la web proporcionado por Qiagen (véase, <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). El límite de regulación se fijó en 2. Un valor de regulación mayor que 2 indica una regulación por aumento, y una regulación menor que 2 negativo indica una regulación negativa o por disminución.

Inmunotransferencia. Se concentró un mililitro del líquido sobrenadante viral filtrado a través de 0.4 ml de una almohadilla de sacarosa al 20% a 14 000 rpm durante 30 minutos. Los sedimentos virales se volvieron a suspender en PBS y tampón de carga 2X seguido de electroforesis PAGE. Los anticuerpos anti-p30 MLV, anti-gp70 y anti-VSV-G se usaron para detectar la expresión de la proteína de la cápside de MLV, la proteína de la envoltura y el VSV-G, respectivamente. La incorporación de proteína de envoltura anfotrópica y/o VSV-G en partículas virales basadas en MLV se detectó usando anti-p30 MLV (ATCC, cat n° CRL-1912) anti-gp70 (83A25) y anti-VSV-G (Abcam, cat n° ab50549) y los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con HRP para detectar la expresión de la proteína de la cápside de MLV (CA), la proteína de la envoltura y VSV-G, respectivamente.

Aislamiento de células dendríticas plasmacitoides de PBMC humanas y cuantificación de IFN α . Se obtuvieron capas leucocitarias del Banco de Sangre de San Diego. Las PBMC se purificaron de la sangre de donantes humanos sanos por centrifugación en gradiente de densidad usando Ficoll-Paque (Cellgro, cat n° MT-25-072-CVRF). El aislamiento de las pDC se enriqueció posteriormente por selección negativa usando perlas magnéticas (Milteny Biotec, cat n° 130-092-207). Las células se mantuvieron en AIM V (Invitrogen cat n° 12055-091) en presencia de IL3 recombinante 10 ng/ml (R & D Systems, cat n° 203-1L). La pureza de las pDC (> 95%) se confirmó por citometría de flujo usando anticuerpos anti-CD45 y anti-CD303 (Miltenyi Biotec cat n° 130-080-201 y 130-090-905). Las células se incubaron con vectores retrovirales con una MOI de 1, 10 o 100 o con un vector lentiviral como control positivo con una MOI de 40. Aproximadamente 36 horas después de la infección, se recogió el líquido sobrenadante para el ensayo ligado a enzimas de tipo sándwich (ELISA, PBL Interferon Source) para cuantificar la cantidad de IFN α . El oligonucleótido sintético CpG ODN2395 se obtuvo de InvivoGen (cat n° tlr-odnc). Se usó una concentración final de 1 µM para activar TLR9 en pDC.

Cinética de replicación del vector RRV que expresa GFP en células tumorales humanas cultivadas, células no transformadas y primarias. Los análisis de FACS y un RRV que contenía un casete IRES-GFP en la dirección 3' de *env* (RRV-GFP) se usaron para controlar la propagación viral a lo largo del tiempo en células cultivadas infectadas. Primero se examinó la extensión de la replicación viral de RRV-GFP en un panel de líneas celulares tumorales humanas establecidas que incluyen U87-MG (glioblastoma), HT1080 (fibrosarcoma), LNCaP (próstata) y Sup-T1 (leucemia de células T). Además, se examinó la replicación viral de RRV-GFP en células primarias establecidas (fibroblastos de pulmón humanos no transformados WI-38 y células endoteliales de vena umbilical humana HUVEC). RRV-GFP se replicaba eficazmente en todas las células tumorales (véase la FIG. 1A-D) e, inesperadamente, en células no transformadas y primarias (véase la FIG. 1E y 1F) que tienen las rutas de señalización de IFN tipo I intactas. El tiempo requerido para que el vector alcance la infectividad máxima variaba en el intervalo de 6 a 28 días, dependiendo en cierta medida de la velocidad de proliferación celular, un determinante principal para la propagación viral eficaz y la infección productiva. La cinética de replicación del RRV-GFP era particularmente lenta en las células LNCaP y WI-38, lo que se correlaciona con su velocidad de proliferación celular lenta en cultivo. Sin embargo, el vector alcanzaba 80-90% de infectividad el día 28 y el día 24 después de infección, respectivamente. Juntos, los datos indicaban que RRV-GFP se replica en tumores que proliferan y fibroblastos primarios y células endoteliales, in vitro.

La replicación de RRV que expresa GFP es sensible a la respuesta antiviral inducida por IFN α / β exógeno. Para retrovirus simples como los RRV basados en MLV, la selectividad hacia las células tumorales depende, al menos en parte, de la proliferación de las células tumorales. Aunque la velocidad de replicación viral no siempre se correlaciona con la proliferación celular, la proliferación es necesaria para la replicación del virus. La ruta del IFN tipo

I tiene una función directa en la regulación de la función antiviral, pero también podría tener un efecto antiviral que se basa únicamente en su efecto antiproliferativo en las células diana. Para diferenciar entre los dos posibles tipos de acciones antivirales, se examinó un panel de líneas celulares derivadas de tumores humanos y células de fibroblastos primarios (WI-38) con el fin de determinar si las células eran sensibles a la respuesta antiviral por IFN α / β exógeno. Primero se comparó la expresión basal e inducida por IFN α de los genes para dos proteínas, PKR y APOBEC3G. PKR es un gen sensible a IFN α / β comúnmente usado para controlar la activación de la ruta de IFN tipo I y se ha mostrado que APOBEC3G inhibe la replicación de retrovirus. Las células se trataron con IFN α exógeno (con 200 U/ml), se recogieron a las 8, 16 y 24 horas después del tratamiento y se midió la expresión génica por qRT-PCR. La expresión del gen PKR y APOBEC3G era inducida tan pronto como a las 8 horas y se mantenía hasta 24 horas después del tratamiento con IFN α exógeno (véase FIG. 2A y 2B). La respuesta al IFN α exógeno era la más alta en las células WI-38 no transformadas, intermedia en las células HT1080 y U87-MG, y la más baja en las células 293T.

Después se llevaron a cabo experimentos adicionales para determinar si la replicación de RRV-GFP era sensible al tratamiento con IFN α / β exógeno. Se seleccionaron células U87-MG para los experimentos debido a la rápida reproducción viral en esta línea celular particular, posiblemente debido a algún defecto en la ruta de IFN tipo I. Como se muestra en la FIG. 2C y 2D, la replicación viral era inhibida completamente por la adición concomitante de IFN β , mientras que se observó replicación viral residual en células tratadas con IFN α . Considerados juntos, los datos indican que las células tumorales HT-1080 y U87-MG estaban respondiendo a IFN α / β tipo I exógeno, aunque los niveles de inducción génica sensible a IFN parecen reducidos en estas células en comparación con los fibroblastos WI-38. Además, en las células U87-MG la respuesta antiviral mediada por IFN dio como resultado una notable atenuación de la replicación viral.

Selección y caracterización de células resistentes a IFN α e IFN β . Puesto que la evasión de la inmunidad innata puede conducir a la replicación viral eficaz, se razonó que la selección de células resistentes a IFN tipo I de un grupo de células tumorales sensibles a IFN puede mejorar todavía más la replicación viral dentro del tumor. Se seleccionaron células U87-MG resistentes a IFN α e IFN β y se investigaron para determinar si RRV-GFP se replicaría más eficazmente en las células resistentes. Después de 21 días de selección en cultivo, las células se recuperaron y se expandieron en ausencia de IFN α / β . Posteriormente, las células resistentes se infectaron con RRV-GFP en ausencia de IFN tipo I exógeno para examinar si la replicación viral era más eficiente en células resistentes a IFN que en las células parentales. Los resultados mostraban que en ausencia de IFN α / β exógeno, las células resistentes a IFN α (U87IRA) presentaban una atenuación significativa en la propagación viral en comparación con las células parentales sensibles a IFN, mientras que las células resistentes a IFN β (U87IRB) presentaban una atenuación marginal en la propagación viral (véase la FIG. 3A y 3B). Como se ha indicado previamente, la atenuación de la propagación viral podría estar asociada con cambios en la proliferación celular, puesto que las líneas celulares resistentes proliferan más lentamente que la línea parental U87-MG.

Para examinar la función de la respuesta antiviral mediada por IFN tipo I en células resistentes a IFN α e IFN β , se determinó la cinética de replicación de RRV-GFP en presencia de IFN α e IFN β exógenos. Como se muestra en la FIG. 3C, la propagación de RRV-GFP en presencia o ausencia de IFN α era comparable en las células resistentes a IFN α . En contraste, RRV-GFP parece propagarse de manera más eficaz en presencia de IFN β durante la etapa temprana de infección en las células resistentes a IFN β (véase FIG. 3D). Los datos contrastan con los hallazgos en las células parentales, en las que la propagación de RRV-GFP era fuertemente inhibida en presencia de IFN α / β exógeno (véase FIG. 2). Además, la resistencia a la acción de IFN α / β exógeno por atenuación de la ruta de señalización se confirmó mostrando la falta de expresión génica inducible por IFN de PKR y APOBEC3G (véase FIG. 3E-F) y los genes específicos de la ruta de IFN tipo I por matriz de PCR (véase la TABLA 1). En conjunto, los datos demuestran que las células se vuelven insensibles al IFN α / β exógeno, aunque la replicación viral en ausencia de IFN α / β exógeno no mejoró en estas células probablemente debido a la co-selección de células de proliferación lenta.

Tabla 1

Símbolo	Datos de regulación	Símbolo	Datos de regulación
ADAR	1.9873	IFNA2	1.8517
ANXA11	1.1042	IFNA4	2.0655
ARL5A	-1.1168	IFNAR1	1.005
ARL5B	-1.0986	IFNAR2	1.0984
ATF5	1.0794	IFNB1	-1.0341
BAG3	-1.0029	IRF1	2.3651
BST2	3.31	IRF2	1.0565
CASP1	1.9532	IRF3	1.1481
CAV1	1.1572	IRF5	1.6968
CBFB	-1.0839	IRF7	1.5248
CD70	1.0196	IRF9	4.3136
CDKN1B	-1.164	ISG15	2.0082
CNP	-1.0393	ISG20	3.2862
COL 16A1	1.0297	ITIH2	1.4393
CXCL10	4.0733	MAL	1.6181
DAD1	-1.0242	MET	-1.0629
DIABLO	1.0232	MNT	1.2253
DNAJB2	1.1605	MX1	3.9026
EIF2AK2	1.1046	MX2	3.5018
GBP1	1.7384	MYD88	1.1711
GBP2	1.5326	NMI	1.6619
GCH1	1.2405	NPEPPS	-1.1283
HLA-A	1.26	NRG1	1.0319
HLA-B	1.1757	OAS1	3.2452
HLA-C	1.8469	OAS2	4.1689
HLA-DOA	1.782	PML	1.0716
HLA-DQA1	1.5557	PRKCZ	-1.0083
HLA-E	1.0399	PRKRA	1.1265
HLA-F	1.5432	PSME2	1.6423
HLA-G	1.6189	PTTG1	1.095

ES 2 745 103 T3

HOXB2	-1.0894
HSPA1L	1.5955
IFI16	1.4628
IFI27	33.7884
IFI30	1.0238
IFI6	1.6737
IFIH1	2.6627
IFIT1	2.6455
IFIT3	2.3001
IFITM1	59.6335
IFITM2	2.0428
IFNA1	-1.0341

RCBTB1	-1.0413
SAMSN1	-1.0072
SH2D1A	-1.0341
SHB	-1.1636
SHFM1	-1.035
SLC1A2	1.0893
STAT1	2.9864
STAT2	1.2106
TAP1	1.6947
TNFSF10	2.608
TRAF3	-1.0376
VEGFA	1.0582

Matriz de expresión génica específica de la ruta de IFN α / β de UIRB + IFN β frente a UIRB

5 El RRV Toca 511 no desencadena la respuesta de IFN α / β en células U87-MG. Los hallazgos anteriores sugieren que RRV-GFP tras entrar o durante su ciclo de vida no desencadena directamente respuestas de IFN α / β en las células hospedantes. Para confirmar que estos resultados de RRV-GFP no eran específicos de vector o transgén, se evaluó la respuesta de IFN α / β a Toca 511 midiendo la expresión génica específica de la ruta en células U87-MG infectadas con Toca 511 con una MOI de 10. Después de 16 horas de la infección por Toca 511, o tratamiento con IFN β , las células se recogieron para el análisis de la expresión génica por matrices de PCR. Varios genes inducibles por IFN α / β tipo I, que incluyen Bst2, CXCL10, PKR, IFI e IFITM, ISG, Mx y OAS en células tratadas con IFN β exógeno, eran regulados por aumento en más de 100 veces en comparación con los de las no tratados (véase FIG. 10 6A y TABLA 2).

Tabla 2

Símbolo	Datos de regulación
ADAR	4.7742
ANXA11	-1.0055
ARL5A	-1.4317
ARL5B	2.4985

Símbolo	Datos de regulación
IFNA2	-1.1607
IFNA4	1.2063
IFNAR1	-2.9714
IFNAR2	1.1112

ES 2 745 103 T3

ATF5	1.1613
BAG3	1.0172
BST2	1617.4733
CASP1	21.5713
CAV1	1.3535
CBFB	1.0103
CD70	1.3273
CDKN1B	-1.0087
CNP	6.9069
COL 16A1	-1.2838
CXCL10	2676.8303
DAD1	-1.634
DIABLO	-1.2717
DNAJB2	1.6018
EIF2AK2	5.2203
GBP1	16.2244
GBP2	10.5918
GCH1	11.106
HLA-A	2.4474
HLA-B	3.4574
HLA-C	-1.2546
HLA-DOA	1.4527
HLA-DQA1	2.3008
HLA-E	2.5727
HLA-F	17.391
HLA-G	1.6656
HOXB2	-1.2182
HSPA1L	1.2386
IFI16	13.5858
IFI27	5216.4306
IFI30	3.6779
IFI6	200.2704
IFIH1	189.4122

IFNB1	-1.1607
IRF1	3.833
IRF2	2.4725
IRF3	1.3113
IRF5	2.0049
IRF7	27.5641
IRF9	5.7587
ISG15	614.4459
ISG20	710.3617
ITIH2	1.0677
MAL	-1.3912
MET	1.1931
MNT	1.1241
MX1	674.8873
MX2	766.8377
MYD88	12.2736
NMI	9.4585
NPEPPS	1.0018
NRG1	-1.3736
OAS1	4456.6355
OAS2	604.2423
PML	5.9472
PRKCZ	-1.4523
PRKRA	-1.7753
PSME2	5.1929
PTTG1	-1.2798
RCBTB1	-1.0819
SAMSN1	-1.2101
SH2D1A	-1.1607
SHB	-1.4886
SHFM1	-1.4931
SLC1A2	-2.8039
STAT1	18.809

ES 2 745 103 T3

IFIT1	798.5864
IFIT3	338.2619
IFITM1	1377.3698
IFITM2	55.5791
IFNA1	-1.1607

STAT2	8.478
TAP1	13.9485
TNFSF10	1325.3374
TRAF3	-1.5026
VEGFA	-1.1514

Matriz de expresión génica específica de la ruta de IFN α / β de U87 + IFN β frente a U87

En contraste, no había inducción global de los genes inducibles por IFN α / β observada en células infectadas con Toca 511 (véase FIG. 6B y Tabla 3).

5 Tabla 3

Símbolo	Datos de regulación
ADAR	-1.1471
ANXA11	1.0367
ARL5A	1.0733
ARL5B	1.0585
ATF5	1.3679
BAG3	-1.0196
BST2	1.805
CASP1	1.0658
CAV1	1.9752
CBFB	-1.4221
CD70	1.1663
CDKN1B	-1.0126
CNP	-1.9834
COL16A1	1.1266
CXCL10	1.4969
DAD1	-1.0056
DIABLO	-1.108
DNAJB2	1.3491

Símbolo	Datos de regulación
IFNA2	1.539
IFNA4	1.8302
IFNAR1	-1.3454
IFNAR2	-1.0928
IFNB1	-1.0928
IRF1	-1.1794
IRF2	-1.2553
IRF3	-1.0928
IRF5	1.6725
IRF7	1.0367
IRF9	1.426
ISG15	1.1583
ISG20	1.2763
ITIH2	1.1423
MAL	1.3679
MET	-1.2553
MNT	1.3122
MX1	-2.0534

EIF2AK2	-1.2995
GBP1	1.1423
GBP2	-1.1392
GCH1	-1.108
HLA-A	1.1423
HLA-B	-1.1392
HLA-C	2.4487
HLA-DOA	2.5175
HLA-DQA1	1.0154
HLA-E	-1.0556
HLA-F	-1.0126
HLA-G	1.4969
HOXB2	-1.2553
HSPA1L	1.3679
IFI16	1.0224
IFI27	1.1266
IFI30	1.1266
IFI6	1.1111
IFIH1	-1.5136
IFIT1	1.2763
IFIT3	1.0154
IFITM1	1.6044
IFITM2	1.2329
IFNA1	-1.0928

MX2	1.387
MYD88	-1.2294
NMI	1.0014
NPEPPS	-1.1157
NRG1	1.3122
OAS1	1.0295
OAS2	-1.3086
PML	-1.6563
PRKCZ	-1.3177
PRKRA	-1.0556
PSME2	1.0882
PTTG1	-1.9561
RCBTB1	-1.041
SAMSN1	-1.4419
SH2D1A	-1.0928
SHB	-1.3547
SHFM1	1.0512
SLC1A2	1.1909
STAT1	-1.2816
STAT2	1.0295
TAP1	-1.108
TNFSF10	1.1826
TRAF3	-1.2294
VEGFA	-1.0056

Matriz de expresión génica específica de la ruta de IFN α/β de U87 + TOCA511 frente a U87

Además de los datos de replicación viral, los datos de la matriz de PCR de expresión génica respaldan más la noción de que los RRV basados en MLV simples no desencadenan directamente la respuesta de IFN tipo I en células tumorales U87-MG sensibles a IFN. Puesto que el genoma viral de RRV (p. ej., Toca 511) comprende dos copias idénticas de ARN monocatenario con estructuras secundarias extensas, el componente de ácido nucleico supuestamente puede servir como un motivo de PAMP potencial durante su ciclo de vida en las células huésped. Es posible que las células U87-MG tengan una ruta de TLR funcional pero sean deficientes en la producción de IFN α/β debido a eliminaciones y reordenamientos en el grupo de genes de IFN situado en el cromosoma 9p21-22.

- 5
- 10
- 15

FIG. 7). Los fibroblastos son células productoras de IFN β clave. Como se muestra en la FIG. 4A, la producción de IFN β se indujo significativamente en ambas líneas celulares tratadas con poli(I:C), mientras que la producción de IFN β era indetectable cuando se trató con Toca 511 a las 8, 16 y 24 horas después de la infección, respectivamente. Por el contrario, no se detectó expresión de IFN α en células CCD-1070Sk ni U87-MG tratadas con poli(I:C) o Toca 511 (véase FIG. 4B). La ausencia de expresión de IFN α como resultado de la inducción secundaria por IFN β en CCD-1070Sk y en células U87-MG probablemente se debía a la recolección de muestras antes de la producción de IFN α , aunque en las células U87-MG la ausencia de inducción de IFN α también podría deberse a la eliminación del grupo de genes IFN α en el cromosoma 9p21-22.

En conjunto, los datos indican que U87-MG mantiene la replicación de RRV basado en MLV incluso cuando las rutas de señalización tanto de TLR (producción de IFN) como de IFN tipo I permanecen al menos parcialmente funcionales en estas células. Una posible explicación para los resultados podría ser la ausencia o el camuflaje de ligandos potenciales para TLR3 en RRV.

Un componente inmunosupresor activo asociado con Toca 511 bloquea la respuesta de IFN α/β en pDC humanas. No puede excluirse la posibilidad de que RRV pueda desencadenar otros PRR tales como TLR7 y TLR9 y que esto pueda ocurrir in vivo en células no malignas dentro del microentorno tumoral. Por lo tanto, se examinó la respuesta antiviral de las células dendríticas plasmacitoides primarias humanas a RRV (un componente del microentorno tumoral en algunos tipos de tumores).

Las pDC son un subconjunto de células dendríticas humanas que expresan de forma diferencial TLR7 y TLR9. Como con los vectores lentivirales, los duplicados de genomas virales de ARN monocatenario encapsulados en las partículas virales de RRV y el ADN bicatenario no metilado que surge de la transcripción inversa dentro de las partículas virales podrían servir potencialmente como motivos de PAMP para TLR7 y TLR9, respectivamente. Se examinó la secuencia de Toca 511 para secuencias ricas en GU que activan TLR y se identificaron varios motivos ricos en GU (que varían de 60-80%) de 20 nucleótidos de longitud situados en la región psi del genoma viral (véase FIG. 8).

Para investigar si el genoma viral de Toca 511 podría ser potencialmente un motivo de PAMP para TLR7 en pDC humanas, se aislaron pDC de PBMC de individuos sanos y se expusieron a Toca 511 con MOI de 1, 10 y 100. Estas células no se replican y, por lo tanto, no se esperaría una infección viral productiva. En los experimentos, ODN2395 (agonista para TLR9) y el vector lentiviral pseudotipado con glucoproteína del virus de la estomatitis vesicular, LV-G (agonista para TLR7), se incluyeron como controles positivos para la inducción de la producción de IFN α en pDC. Los datos demuestran que Toca 511, incluso con MOI altos, no inducía la producción de IFN α en pDC humanas, mientras que se detectó un nivel significativo de producción de IFN α en células tratadas con ODN2395 y LV-G (véase FIG. 5A). La producción de IFN α por pDC tratadas con LV-G demuestra que la transducción de pDC murinas con un vector lentiviral pseudotipado con glucoproteína del virus de la estomatitis vesicular inducía la producción de IFN α . Además, los experimentos de pDC se llevaron a cabo usando preparaciones de pDC de ratón expuestas a RRV y LV-G, con resultados esencialmente idénticos a los mostrados aquí con las preparaciones de pDC humanas (véase la figura 9).

A continuación, se exploró la posibilidad de que la glucoproteína viral implicada en la entrada celular desempeñe un papel en la determinación de la localización subcelular de la partícula viral tras la entrada y su exposición a inmunosensores celulares. Para este fin, se generó Toca 511 con proteínas tanto anfotrópicas como VSV-G en las partículas virales para redirigir Toca 511 a la ruta endocítica. Como se muestra en la FIG. 5B, tanto las proteínas anfotrópicas de *env* como VSV-G se incorporaron de forma eficaz en partículas virales, con una ligera disminución de la incorporación de *env* anfotrópica cuando se coexpresó VSV-G. Además, mediante qPCR, se confirmó la función de VSV-G para dirigir la entrada viral y la transducción de un ciclo, lo que da como resultado la integración del ADN proviral en el genoma del hospedante, usando células CHO-K1 que son permisivas para RRV pseudotipados con VSV-G pero no para RRV con envoltura anfotrópica. Después se examinó Toca 511 pseudotipado con VSV-G que dirige las partículas virales preferentemente hacia la ruta endocítica, que podría desencadenar la activación de los TLR endosomales (TLR7/8 o TLR9). Las pDC humanas cultivadas se trataron con Toca 511 o Toca 511 co-envuelto con VSV-G. De acuerdo con los datos anteriores, Toca 511 por sí solo no estimuló las pDC humanas para producir IFN α , Toca 511 co-envuelto con VSV-G tampoco activó TLR endosomales en pDC humanos (véase FIG. 5C).

El componente inmunosupresor asociado con Toca 511 puede ser anulado por inactivación por calor para desencadenar la respuesta de IFN α/β en pDC humanas. Una explicación para el descubrimiento de que Toca 511 no desencadena la respuesta de tipo IFN en pDC humanas es que un componente inmunosupresor está asociado con partículas de RRV. Para investigar si el método clásico de inactivación viral por calor inactivaría un componente supresor y, por lo tanto, permitiría la inducción de la expresión de IFN α/β , Toca 511 se trató con calor a 56°C durante 30 minutos antes de la exposición a pDC en cultivo. Los datos pusieron de manifiesto que, en contraste con Toca 511 no tratada, Toca 511 inactivada por calor inducía una producción notable de IFN α por pDC (véase FIG. 5D). Se obtuvo un resultado similar cuando Toca 511 co-envuelto con VSV-G se trató por inactivación por calor (FIG. 5D). Los datos prueban que un componente inmunosupresor activo está asociado con Toca 511 y puede ser inactivado por tratamiento con calor.

Después se llevaron a cabo experimentos en los que Toca 511 inactivado por calor se incubó conjuntamente con Toca 511 no tratado o con vector lentiviral en una relación 1:1 (unidad de transducción) antes de la exposición a pDC. Los datos indicaban que la incubación conjunta de Toca 511 con Toca 511 inactivado por calor o con vector lentiviral pseudotipado con VSV-G daba como resultado el bloqueo de la producción de IFN α en pDC humanas (véase FIG. 5E). Juntos, los datos indican que hay un componente inmunosupresor activo asociado con partículas virales y que la inactivación por calor de las partículas virales anula la función inmunosupresora, lo que conduce a la producción de IFN α en pDC. Los datos de inactivación por calor también indican que no se requiere infección productiva para la activación de respuestas innatas celulares en pDC.

El componente inmunosupresor asociado con Toca 511 no se debe a la presencia de la glucoproteína de la envoltura anfotrópica. Para examinar si el componente inmunosupresor reside en la glucoproteína de la envoltura anfotrópica, se generaron 3 vectores retrovirales defectuosos en la replicación pseudotipados con la glucoproteína anfotrópica (MLV-A), VSV-G (MLV-G) o de la envoltura anfotrópica y las glucoproteínas VSV-G (MLV-A + G). El genoma de ARN viral (pBA9b) usado en la generación de estos vectores comparte una homología de secuencia de 100% con Toca 511 en la región de *psi*, en la que están presentes varios motivos de secuencia ricos en GU (véase FIG. 8). De acuerdo con los datos previos, ninguno de los 3 vectores estimulaba las pDC para producir IFN α (véase FIG. 5F). Sin embargo, cuando estos vectores se sometieron a inactivación por calor, los 3 vectores estimularon las pDC para producir IFN α (véase FIG. 5G). Colectivamente los datos indicaban que un componente inmunosupresor asociado con vectores basados en MLV bloquea la activación de TLR endosomales en pDC y la posterior inducción de la producción de IFN tipo I y que la función del componente inmunosupresor asociado con partículas virales (Toca 511, Toca 511-G, MLV-A, MLV-G y MLV-A + G) es un proceso activo dominante. Lo que es más importante, la falta de producción de IFN α en pDC expuestas al vector de replicación defectuosa pseudotipado con glucoproteína VSV-G indica que el componente inmunosupresor asociado con las partículas virales no era atribuible a la glucoproteína de la envoltura anfotrópica.

Para investigar si el componente es sensible al tratamiento enzimático que puede alterar los componentes proteicos de las partículas virales, se examinó el efecto de las desglucosidasas, PLC y tripsina en la estimulación de pDC. Como se ve en la FIG. 5H, el patrón de electroforesis de la poliproteína gag de Toca 511 tratada con calor era comparable al de no tratado con calor. La incubación conjunta de desglucosidasas, PLC o tripsina con Toca 511 altera más el patrón de electroforesis de la poliproteína gag y/o la proteína de la envoltura. Por ejemplo, tanto las desglucosidasas como el tratamiento con tripsina dieron como resultado un cambio en la intensidad de la poliproteína gag y una disminución en el tamaño molecular y/o la desaparición de la banda de gp70. Toca 511 se trató con desglucosidasas, PLC o tripsina y se incubó conjuntamente con Toca 511 tratada con calor antes de la exposición a pDC en cultivo. Los datos pusieron de manifiesto que la incubación conjunta de Toca 511 tratado con tripsina, pero no tratado con desglucosidasa o tratado con PLC, con Toca 511 tratado con calor anulaba la actividad inmunosupresora dominante de Toca 511 e inducía parcialmente la producción de IFN α en pDC (FIG. 5I).

Juntos, los datos indican que hay un componente inmunosupresor activo asociado con las partículas virales de Toca 511 y que el tratamiento con calor o tripsina de la partícula viral de Toca 511 anula la función inmunosupresora, lo que conduce a la producción de IFN α en pDC. Los datos de tripsina fortalecen más la notación de que el componente inmunosupresor es un componente proteico. Los datos también indican que no se requiere infección productiva para la activación de respuestas celulares innatas en pDC.

El componente inmunosupresor asociado con Toca 511 no se debe a la presencia de la gluco-gag ni a la glucoproteína de la envoltura anfotrópica. Se ha mostrado que gluco-gag (Pr80gag) expresado a partir de retrovirus se incorpora a partículas virales y tiene una función en la inhibición de la función de APOBEC3 en las células diana. Además, se ha descrito un péptido inmunosupresor ubicado en la subunidad TM de varias proteínas de la envoltura de MLV. Para preguntar dónde reside el componente inmunosupresor en las partículas virales, se generaron 3 vectores retrovirales no replicantes pseudotipados con la glucoproteína anfotrópica (MLV-A), VSV-G (MLV-G) o de la envoltura anfotrópica y las glucoproteínas VSV-G (MLV-A+G) que no expresan gluco-gag. El ARN viral (pBA9b) usado en la generación de estos vectores comparte una homología de secuencia de 100% con Toca 511 en la región de *psi*, en la que están presentes varios motivos de secuencia ricos en GU. De acuerdo con los datos anteriores, ninguno de los 3 vectores estimuló los pDC para producir IFN α (Figura 10A). Sin embargo, cuando estos vectores se sometieron a tratamiento térmico, los 3 vectores estimularon las pDC para producir IFN α (FIG. 10B).

Para examinar más si la glucoproteína de la envoltura podría ser parte del componente inmunosupresor, se generaron VLP sin envoltura empaquetadas con pBA9b (VLP/pBA9b) o sin el vector pBA9b (VLP). De acuerdo con los datos observados, las VLP y VLP/pBA9b no inducían la producción de IFN α en pDC, mientras que las VLP y VLP/pBA9b tratadas con calor sí lo hacían (FIG. 10C). En conjunto, los datos indican que un componente inmunosupresor asociado con partículas virales basadas en MLV bloquea la producción de IFN tipo I en pDC y que la función del componente inmunosupresor asociado con partículas virales (Toca 511, Toca 511-G, MLV-A, MLV-G y MLV-A+G) es un proceso activo dominante. Además, la incapacidad de MLV-A, MLV-G, y los vectores MLV-A+G para estimular la producción de IFN α en pDC en ausencia de gluco-gag sugiere que el gluco-gag no es parte del componente inmunosupresor. Además, la función inmunosupresora probablemente no se pueda atribuir a la glucoproteína de la envoltura anfotrópica. Finalmente, la capacidad de las VLP sin ARN viral de pBA9b y después del tratamiento con calor para inducir la producción de IFN α en pDC también sugiere que posiblemente haya otro PAMP, además del ARN viral, presente en las partículas virales.

Internalización de Toca 511 y VLP por pDC. La capacidad de las VLP que transportan o carecen del ARN viral de pBA9b para inducir la producción de IFN α en las pDC sugiere que el PRR puede encontrarse en la superficie celular ya que no se espera que las VLP se internalicen de forma eficaz en ausencia de la proteína de envoltura. Se examinó la capacidad de las pDC inmaduras recién aisladas para internalizar Toca 511 y VLP que carecen del ARN viral de pBA9b usando Toca 511 marcado con CFSE y VLP. La FIG. 10D muestra que tanto Toca 511 como las VLP (tratadas con calor o sin tratar con calor) eran internalizados rápidamente por pDC según lo medido por la intensidad de fluorescencia media (MFI), sugiriendo que el proceso de internalización en pDC es independiente del receptor Pit-2. Sin embargo, la internalización de las VLP tratadas con calor siempre era menos eficaz. Es interesante que se observó una disminución en MFI a lo largo de un transcurso de 6 h después de incubación con la excepción de las VLP tratadas con calor. Una posible explicación es el recambio de proteínas virales después de la internalización. Dado que tanto Toca 511 como las VLP pueden ser internalizados por pDC, el compartimento celular de los PRR no identificado no está limitado a la superficie celular.

El PAMP de ácido nucleico no viral asociado a Toca 511 es sensible al tratamiento con desglucosidasas, tripsina y PLC. Para caracterizar más el PAMP de ácido nucleico no viral no identificado asociado con Toca 511, se examinó la sensibilidad al tratamiento enzimático que puede alterar la proteína, pero no el ácido nucleico, componentes de las partículas virales. Se examinó el efecto de las desglucosidasas, PLC y tripsina en la estimulación de pDC. Como se ve en la FIG. 10E, las alteraciones de las proteínas virales mostradas en la FIG. 5H se correlaciona con la pérdida de su capacidad para inducir la producción de IFN α en pDC después de tratamiento térmico. En contraste con el componente inmunosupresor asociado con Toca 511, que es sensible solo a la tripsina, el componente inmunostimulador asociado con las partículas virales de Toca 511 es sensible a las desglucosidasas, PLC y tripsina. Todos juntos, los datos sugieren que tanto los componentes inmunostimuladores como los inmunosupresores son probablemente elementos estructurales y, por lo tanto, basados en proteínas virales, pero, en el caso del componente inmunostimulador, también implica componentes lipídicos y/o de hidratos de carbono.

Listado de Secuencias

- 25 <110> Tocagen Inc.
- <120> COMPONENTES INMUNOSUPRESORES ASOCIADOS CON VECTORES DE REPLICACIÓN RETROVIRALES
- <130> JWJ02188EP
- <140> 14810447.4
- 30 <141> 2014-06-15
- <150> PCT/US2014/042444
- <151> 2014-06-15
- <150> US 61/835,545
- <151> 2013-06-15
- 35 <160> 4
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 5277
- <212> DNA
- 40 <213> Virus de la leucemia murina
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(5277)

ES 2 745 103 T3

```

<400> 1
atg ggc cag act gtt acc act ccc tta agt ttg acc tta ggt cac tgg      48
Met Gly Gln Thr Val Thr Thr Pro Leu Ser Leu Thr Leu Gly His Trp
1          5          10          15

aaa gat gtc gag cgg atc gct cac aac cag tcg gta gat gtc aag aag      96
Lys Asp Val Glu Arg Ile Ala His Asn Gln Ser Val Asp Val Lys Lys
          20          25          30

aga cgt tgg gtt acc ttc tgc tct gca gaa tgg cca acc ttt aac gtc     144
Arg Arg Trp Val Thr Phe Cys Ser Ala Glu Trp Pro Thr Phe Asn Val
          35          40          45

gga tgg ccg cga gac ggc acc ttt aac cga gac ctc atc acc cag gtt     192
Gly Trp Pro Arg Asp Gly Thr Phe Asn Arg Asp Leu Ile Thr Gln Val
          50          55          60

aag atc aag gtc ttt tca cct ggc ccg cat gga cac cca gac cag gtc     240
Lys Ile Lys Val Phe Ser Pro Gly Pro His Gly His Pro Asp Gln Val
65          70          75          80

ccc tac atc gtg acc tgg gaa gcc ttg gct ttt gac ccc cct ccc tgg     288
Pro Tyr Ile Val Thr Trp Glu Ala Leu Ala Phe Asp Pro Pro Pro Trp
          85          90          95

gtc aag ccc ttt gta cac cct aag cct ccg cct cct ctt cct cca tcc     336
Val Lys Pro Phe Val His Pro Lys Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Ser
          100          105          110

gcc ccg tct ctc ccc ctt gaa cct cct cgt tcg acc ccg cct cga tcc     384
Ala Pro Ser Leu Pro Leu Glu Pro Pro Arg Ser Thr Pro Pro Arg Ser

```

ES 2 745 103 T3

115				120				125								
tcc	ctt	tat	cca	gcc	ctc	act	cct	tct	cta	ggc	gcc	aaa	cct	aaa	cct	432
Ser	Leu	Tyr	Pro	Ala	Leu	Thr	Pro	Ser	Leu	Gly	Ala	Lys	Pro	Lys	Pro	
	130					135						140				
caa	gtt	ctt	tct	gac	agt	ggg	ggg	ccg	ctc	atc	gac	cta	ctt	aca	gaa	480
Gln	Val	Leu	Ser	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Ile	Asp	Leu	Leu	Thr	Glu	
	145				150					155					160	
gac	ccc	ccg	cct	tat	agg	gac	cca	aga	cca	ccc	cct	tcc	gac	agg	gac	528
Asp	Pro	Pro	Pro	Tyr	Arg	Asp	Pro	Arg	Pro	Pro	Pro	Ser	Asp	Arg	Asp	
				165					170					175		
gga	aat	ggt	gga	gaa	gcg	acc	cct	gcg	gga	gag	gca	ccg	gac	ccc	tcc	576
Gly	Asn	Gly	Gly	Glu	Ala	Thr	Pro	Pro	Ala	Gly	Glu	Ala	Pro	Asp	Pro	Ser
			180					185						190		
cca	atg	gca	tct	cgc	cta	cgt	ggg	aga	cgg	gag	ccc	cct	gtg	gcc	gac	624
Pro	Met	Ala	Ser	Arg	Leu	Arg	Gly	Arg	Arg	Glu	Pro	Pro	Val	Ala	Asp	
	195					200						205				
tcc	act	acc	tcg	cag	gca	ttc	ccc	ctc	cgc	gca	gga	gga	aac	gga	cag	672
Ser	Thr	Thr	Ser	Gln	Ala	Phe	Pro	Leu	Arg	Ala	Gly	Gly	Asn	Gly	Gln	
	210					215					220					
ctt	caa	tac	tggt	ccg	ttc	tcc	tct	tct	gac	ctt	tac	aac	tggt	aaa	aat	720
Leu	Gln	Tyr	Trp	Pro	Phe	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Tyr	Asn	Trp	Lys	Asn	
	225				230					235					240	
aat	aac	cct	tct	ttt	tct	gaa	gat	cca	ggt	aaa	ctg	aca	gct	ctg	atc	768
Asn	Asn	Pro	Ser	Phe	Ser	Glu	Asp	Pro	Gly	Lys	Leu	Thr	Ala	Leu	Ile	
				245					250					255		
gag	tct	ggt	ctc	atc	acc	cat	cag	ccc	acc	tggt	gac	gac	tgt	cag	cag	816
Glu	Ser	Val	Leu	Ile	Thr	His	Gln	Pro	Thr	Trp	Asp	Asp	Cys	Gln	Gln	
			260					265					270			
ctg	ttg	ggg	act	ctg	ctg	acc	gga	gaa	gaa	aaa	caa	ccg	gtg	ctc	tta	864
Leu	Leu	Gly	Thr	Leu	Leu	Thr	Gly	Glu	Glu	Lys	Gln	Arg	Val	Leu	Leu	
		275					280					285				
gag	gct	aga	aag	gcg	gtg	cggt	ggc	gat	gat	ggg	cggt	ccc	act	caa	ctg	912
Glu	Ala	Arg	Lys	Ala	Val	Arg	Gly	Asp	Asp	Gly	Arg	Pro	Thr	Gln	Leu	
	290					295						300				
ccc	aat	gaa	gtc	gat	gcc	gct	ttt	ccc	ctc	gag	cggt	cca	gac	tggt	gat	960
Pro	Asn	Glu	Val	Asp	Ala	Ala	Phe	Pro	Leu	Glu	Arg	Pro	Asp	Trp	Asp	
	305				310					315				320		
tac	acc	acc	cag	gca	ggt	agg	aac	cac	cta	gtc	cac	tat	cggt	cag	ttg	1008
Tyr	Thr	Thr	Gln	Ala	Gly	Arg	Asn	His	Leu	Val	His	Tyr	Arg	Gln	Leu	
				325					330					335		
ctc	cta	gcg	ggt	ctc	caa	aac	gcg	ggc	aga	agc	ccc	acc	aat	ttg	gcc	1056
Leu	Leu	Ala	Gly	Leu	Gln	Asn	Ala	Gly	Arg	Ser	Pro	Thr	Asn	Leu	Ala	
			340					345					350			
aag	gta	aaa	gga	ata	aca	caa	ggg	ccc	aat	gag	tct	ccc	tcg	gcc	ttc	1104
Lys	Val	Lys	Gly	Ile	Thr	Gln	Gly	Pro	Asn	Glu	Ser	Pro	Ser	Ala	Phe	
		355					360					365				
cta	gag	aga	ctt	aag	gaa	gcc	tat	cggt	agg	tac	act	cct	tat	gac	cct	1152

ES 2 745 103 T3

Leu	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Ala	Tyr	Arg	Arg	Tyr	Thr	Pro	Tyr	Asp	Pro		
370						375					380						
gag	gac	cca	ggg	caa	gaa	act	aat	gtg	tct	atg	tct	ttc	att	tgg	cag		1200
Glu	Asp	Pro	Gly	Gln	Glu	Thr	Asn	Val	Ser	Met	Ser	Phe	Ile	Trp	Gln		
385					390					395					400		
tct	gcc	cca	gac	att	ggg	aga	aag	tta	gag	agg	tta	gaa	gat	tta	aaa		1248
Ser	Ala	Pro	Asp	Ile	Gly	Arg	Lys	Leu	Glu	Arg	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys		
				405					410					415			
aac	aag	acg	ctt	gga	gat	ttg	ggt	aga	gag	gca	gaa	aag	atc	ttt	aat		1296
Asn	Lys	Thr	Leu	Gly	Asp	Leu	Val	Arg	Glu	Ala	Glu	Lys	Ile	Phe	Asn		
			420					425					430				
aaa	cga	gaa	acc	ccg	gaa	gaa	aga	gag	gaa	cgt	atc	agg	aga	gaa	aca		1344
Lys	Arg	Glu	Thr	Pro	Glu	Glu	Arg	Glu	Glu	Arg	Ile	Arg	Arg	Glu	Thr		
			435				440					445					
gag	gaa	aaa	gaa	gaa	cgc	cgt	agg	aca	gag	gat	gag	cag	aaa	gag	aaa		1392
Glu	Glu	Lys	Glu	Glu	Arg	Arg	Thr	Glu	Asp	Glu	Gln	Lys	Glu	Lys			
			450			455					460						
gaa	aga	gat	cgt	agg	aga	cat	aga	gag	atg	agc	aag	cta	ttg	gcc	act		1440
Glu	Arg	Asp	Arg	Arg	Arg	His	Arg	Glu	Met	Ser	Lys	Leu	Leu	Ala	Thr		
				470						475					480		
gtc	ggt	agt	gga	cag	aaa	cag	gat	aga	cag	gga	gga	gaa	cga	agg	agg		1488
Val	Val	Ser	Gly	Gln	Lys	Gln	Asp	Arg	Gln	Gly	Gly	Glu	Arg	Arg	Arg		
				485					490					495			
tcc	caa	ctc	gat	cgc	gac	cag	tgt	gcc	tac	tgc	aaa	gaa	aag	ggg	cac		1536
Ser	Gln	Leu	Asp	Arg	Asp	Gln	Cys	Ala	Tyr	Cys	Lys	Glu	Lys	Gly	His		
				500				505					510				
tgg	gct	aaa	gat	tgt	ccc	aag	aaa	cca	cga	gga	cct	cgg	gga	cca	aga		1584
Trp	Ala	Lys	Asp	Cys	Pro	Lys	Lys	Pro	Arg	Gly	Pro	Arg	Gly	Pro	Arg		
				515			520					525					
ccc	cag	acc	tcc	ctc	ctg	acc	cta	gat	gac	tag	gga	ggt	cag	ggt	cag		1632
Pro	Gln	Thr	Ser	Leu	Leu	Thr	Leu	Asp	Asp		Gly	Gly	Gln	Gly	Gln		
				530		535						540					
gag	ccc	ccc	cct	gaa	ccc	agg	ata	acc	ctc	aaa	gtc	ggg	ggg	caa	ccc		1680
Glu	Pro	Pro	Pro	Glu	Pro	Arg	Ile	Thr	Leu	Lys	Val	Gly	Gly	Gln	Pro		
				545		550					555						
gtc	acc	ttc	ctg	gta	gat	act	ggg	gcc	caa	cac	tcc	gtg	ctg	acc	caa		1728
Val	Thr	Phe	Leu	Val	Asp	Thr	Gly	Ala	Gln	His	Ser	Val	Leu	Thr	Gln		
					565					570					575		
aat	cct	gga	ccc	cta	agt	gat	aag	tct	gcc	tgg	gtc	caa	ggg	gct	act		1776
Asn	Pro	Gly	Pro	Leu	Ser	Asp	Lys	Ser	Ala	Trp	Val	Gln	Gly	Ala	Thr		
				580					585					590			
gga	gga	aag	cgg	tat	cgc	tgg	acc	acg	gat	cgc	aaa	gta	cat	cta	gct		1824
Gly	Gly	Lys	Arg	Tyr	Arg	Trp	Thr	Thr	Asp	Arg	Lys	Val	His	Leu	Ala		
				595				600					605				
acc	ggt	aag	gtc	acc	cac	tct	ttc	ctc	cat	gta	cca	gac	tgt	ccc	tat		1872
Thr	Gly	Lys	Val	Thr	His	Ser	Phe	Leu	His	Val	Pro	Asp	Cys	Pro	Tyr		
			610				615					620					

ES 2 745 103 T3

cct ctg tta gga aga gat ttg ctg act aaa cta aaa gcc caa atc cac Pro Leu Leu Gly Arg Asp Leu Leu Thr Lys Leu Lys Ala Gln Ile His 625 630 635	1920
ttt gag gga tca gga gct cag gtt atg gga cca atg ggg cag ccc ctg Phe Glu Gly Ser Gly Ala Gln Val Met Gly Pro Met Gly Gln Pro Leu 640 645 650 655	1968
caa gtg ttg acc cta aat ata gaa gat gag cat cgg cta cat gag acc Gln Val Leu Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His Arg Leu His Glu Thr 660 665 670	2016
tca aaa gag cca gat gtt tct cta ggg tcc aca tgg ctg tct gat ttt Ser Lys Glu Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr Trp Leu Ser Asp Phe 675 680 685	2064
cct cag gcc tgg gcg gaa acc ggg ggc atg gga ctg gca gtt cgc caa Pro Gln Ala Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly Leu Ala Val Arg Gln 690 695 700	2112
gct cct ctg atc ata cct ctg aaa gca acc tct acc ccc gtg tcc ata Ala Pro Leu Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr Pro Val Ser Ile 705 710 715	2160
aaa caa tac ccc atg tca caa gaa gcc aga ctg ggg atc aag ccc cac Lys Gln Tyr Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu Gly Ile Lys Pro His 720 725 730 735	2208
ata cag aga ctg ttg gac cag gga ata ctg gta ccc tgc cag tcc ccc Ile Gln Arg Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val Pro Cys Gln Ser Pro 740 745 750	2256
tgg aac acg ccc ctg cta ccc gtt aag aaa cca ggg act aat gat tat Trp Asn Thr Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro Gly Thr Asn Asp Tyr 755 760 765	2304
agg cct gtc cag gat ctg aga gaa gtc aac aag cgg gtg gaa gac atc Arg Pro Val Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys Arg Val Glu Asp Ile 770 775 780	2352
cac ccc acc gtg ccc aac cct tac aac ctc ttg agc ggg ctc cca ccg His Pro Thr Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu Ser Gly Leu Pro Pro 785 790 795	2400
tcc cac cag tgg tac act gtg ctt gat tta aag gat gcc ttt ttc tgc Ser His Gln Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys Asp Ala Phe Phe Cys 800 805 810 815	2448
ctg aga ctc cac ccc acc agt cag cct ctc ttc gcc ttt gag tgg aga Leu Arg Leu His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe Ala Phe Glu Trp Arg 820 825 830	2496
gat cca gag atg gga atc tca gga caa ttg acc tgg acc aga ctc cca Asp Pro Glu Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr Trp Thr Arg Leu Pro 835 840 845	2544
cag ggt ttc aaa aac agt ccc acc ctg ttt gat gag gca ctg cac aga Gln Gly Phe Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp Glu Ala Leu His Arg 850 855 860	2592
gac cta gca gac ttc cgg atc cag cac cca gac ttg atc ctg cta cag Asp Leu Ala Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp Leu Ile Leu Leu Gln 865 870 875	2640

ES 2 745 103 T3

tac gtg gat gac tta ctg ctg gcc gcc act tct gag cta gac tgc caa Tyr Val Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser Glu Leu Asp Cys Gln 880 885 890 895	2688
caa ggt act cgg gcc ctg tta caa acc cta ggg aac ctc ggg tat cgg Gln Gly Thr Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly Asn Leu Gly Tyr Arg 900 905 910	2736
gcc tcg gcc aag aaa gcc caa att tgc cag aaa cag gtc aag tat ctg Ala Ser Ala Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys Gln Val Lys Tyr Leu 915 920 925	2784
ggg tat ctt cta aaa gag ggt cag aga tgg ctg act gag gcc aga aaa Gly Tyr Leu Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu Thr Glu Ala Arg Lys 930 935 940	2832
gag act gtg atg ggg cag cct act ccg aag acc cct cga caa cta agg Glu Thr Val Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr Pro Arg Gln Leu Arg 945 950 955	2880
gag ttc cta ggg acg gca ggc ttc tgt cgc ctc tgg atc cct ggg ttt Glu Phe Leu Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu Trp Ile Pro Gly Phe 960 965 970 975	2928
gca gaa atg gca gcc ccc ttg tac cct ctc acc aaa acg ggg act ctg Ala Glu Met Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr Lys Thr Gly Thr Leu 980 985 990	2976
ttt aat tgg ggc cca gac caa caa aag gcc tat caa gaa atc aag caa Phe Asn Trp Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Lys Gln 995 1000 1005	3024
gct ctt cta act gcc cca gcc ctg ggg ttg cca gat ttg act aag Ala Leu Leu Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro Asp Leu Thr Lys 1010 1015 1020	3069
ccc ttt gaa ctc ttt gtc gac gag aag cag ggc tac gcc aaa ggt Pro Phe Glu Leu Phe Val Asp Glu Lys Gln Gly Tyr Ala Lys Gly 1025 1030 1035	3114
gtc cta acg caa aaa ctg gga cct tgg cgt cgg ccg gtg gcc tac Val Leu Thr Gln Lys Leu Gly Pro Trp Arg Arg Pro Val Ala Tyr 1040 1045 1050	3159
ctg tcc aaa aag cta gac cca gta gca gct ggg tgg ccc cct tgc Leu Ser Lys Lys Leu Asp Pro Val Ala Ala Gly Trp Pro Pro Cys 1055 1060 1065	3204
cta cgg atg gta gca gcc att gcc gta ctg aca aag gat gca ggc Leu Arg Met Val Ala Ala Ile Ala Val Leu Thr Lys Asp Ala Gly 1070 1075 1080	3249
aag cta acc atg gga cag cca cta gtc att ctg gcc ccc cat gca Lys Leu Thr Met Gly Gln Pro Leu Val Ile Leu Ala Pro His Ala 1085 1090 1095	3294
gta gag gca cta gtc aaa caa ccc ccc gac cgc tgg ctt tcc aat Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro Asp Arg Trp Leu Ser Asn 1100 1105 1110	3339
ctg gcc ccc cat gca gta gag gca cta gtt aag caa ccc ccc gat Leu Ala Pro His Ala Val Glu Ala Leu Val Lys Gln Pro Pro Asp 1115 1120 1125	3384

ES 2 745 103 T3

1115	1120	1125	
cgc tgg ctc tcc aac gcc cgg atg act cac tat cag gcc ttg ctt			3429
Arg Trp Leu Ser Asn Ala Arg Met Thr His Tyr Gln Ala Leu Leu			
1130	1135	1140	
ttg gac acg gac cgg gtc cag ttc gga ccg gtg gta gcc ctg aac			3474
Leu Asp Thr Asp Arg Val Gln Phe Gly Pro Val Val Ala Leu Asn			
1145	1150	1155	
ccg gct acg ctg ctc cca ctg cct gag gaa ggg ctg caa cac aac			3519
Pro Ala Thr Leu Leu Pro Leu Pro Glu Glu Gly Leu Gln His Asn			
1160	1165	1170	
tgc ctt gat atc ctg gcc gaa gcc cac gga acc cga ccc gac cta			3564
Cys Leu Asp Ile Leu Ala Glu Ala His Gly Thr Arg Pro Asp Leu			
1175	1180	1185	
acg gac cag ccg ctc cca gac gcc gac cac acc tgg tac acg gat			3609
Thr Asp Gln Pro Leu Pro Asp Ala Asp His Thr Trp Tyr Thr Asp			
1190	1195	1200	
gga agc agt ctc tta caa gag gga cag cgt aag gcg gga gct gcg			3654
Gly Ser Ser Leu Leu Gln Glu Gly Gln Arg Lys Ala Gly Ala Ala			
1205	1210	1215	
gtg acc acc gag acc gag gta atc tgg gct aaa gcc ctg cca gcc			3699
Val Thr Thr Glu Thr Glu Val Ile Trp Ala Lys Ala Leu Pro Ala			
1220	1225	1230	
ggg aca tcc gct cag cgg gct gaa ctg ata gca ctc acc cag gcc			3744
Gly Thr Ser Ala Gln Arg Ala Glu Leu Ile Ala Leu Thr Gln Ala			
1235	1240	1245	
cta aag atg gca gaa ggt aag aag cta aat gtt tat act gat agc			3789
Leu Lys Met Ala Glu Gly Lys Lys Leu Asn Val Tyr Thr Asp Ser			
1250	1255	1260	
cgt tat gct ttt gct act gcc cat atc cat gga gaa ata tac aga			3834
Arg Tyr Ala Phe Ala Thr Ala His Ile His Gly Glu Ile Tyr Arg			
1265	1270	1275	
agg cgt ggg ttg ctc aca tca gaa ggc aaa gag atc aaa aat aaa			3879
Arg Arg Gly Leu Leu Thr Ser Glu Gly Lys Glu Ile Lys Asn Lys			
1280	1285	1290	
gac gag atc ttg gcc cta cta aaa gcc ctc ttt ctg ccc aaa aga			3924
Asp Glu Ile Leu Ala Leu Leu Lys Ala Leu Phe Leu Pro Lys Arg			
1295	1300	1305	
ctt agc ata atc cat tgt cca gga cat caa aag gga cac agc gcc			3969
Leu Ser Ile Ile His Cys Pro Gly His Gln Lys Gly His Ser Ala			
1310	1315	1320	
gag gct aga ggc aac cgg atg gct gac caa gcg gcc cga aag gca			4014
Glu Ala Arg Gly Asn Arg Met Ala Asp Gln Ala Ala Arg Lys Ala			
1325	1330	1335	
gcc atc aca gag act cca gac acc tct acc ctc ctc ata gaa aat			4059
Ala Ile Thr Glu Thr Pro Asp Thr Ser Thr Leu Leu Ile Glu Asn			
1340	1345	1350	
tca tca ccc tac acc tca gaa cat ttt cat tac aca gtg act gat			4104

ES 2 745 103 T3

Ser	Ser	Pro	Tyr	Thr	Ser	Glu	His	Phe	His	Tyr	Thr	Val	Thr	Asp		
		1355					1360					1365				
ata	aag	gac	cta	acc	aag	ttg	ggg	gcc	att	tat	gat	aaa	aca	aag		4149
Ile	Lys	Asp	Leu	Thr	Lys	Leu	Gly	Ala	Ile	Tyr	Asp	Lys	Thr	Lys		
		1370					1375					1380				
aag	tat	tgg	gtc	tac	caa	gga	aaa	cct	gtg	atg	cct	gac	cag	ttt		4194
Lys	Tyr	Trp	Val	Tyr	Gln	Gly	Lys	Pro	Val	Met	Pro	Asp	Gln	Phe		
		1385					1390					1395				
act	ttt	gaa	tta	tta	gac	ttt	ctt	cat	cag	ctg	act	cac	ctc	agc		4239
Thr	Phe	Glu	Leu	Leu	Asp	Phe	Leu	His	Gln	Leu	Thr	His	Leu	Ser		
		1400					1405					1410				
ttc	tca	aaa	atg	aag	gct	ctc	cta	gag	aga	agc	cac	agt	ccc	tac		4284
Phe	Ser	Lys	Met	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu	Arg	Ser	His	Ser	Pro	Tyr		
		1415					1420					1425				
tac	atg	ctg	aac	cgg	gat	cga	aca	ctc	aaa	aat	atc	act	gag	acc		4329
Tyr	Met	Leu	Asn	Arg	Asp	Arg	Thr	Leu	Lys	Asn	Ile	Thr	Glu	Thr		
		1430					1435					1440				
tgc	aaa	gct	tgt	gca	caa	gtc	aac	gcc	agc	aag	tct	gcc	gtt	aaa		4374
Cys	Lys	Ala	Cys	Ala	Gln	Val	Asn	Ala	Ser	Lys	Ser	Ala	Val	Lys		
		1445					1450					1455				
cag	gga	act	agg	gtc	cgc	ggg	cat	cgg	ccc	ggc	act	cat	tgg	gag		4419
Gln	Gly	Thr	Arg	Val	Arg	Gly	His	Arg	Pro	Gly	Thr	His	Trp	Glu		
		1460					1465					1470				
atc	gat	ttc	acc	gag	ata	aag	ccc	gga	ttg	tat	ggc	tat	aaa	tat		4464
Ile	Asp	Phe	Thr	Glu	Ile	Lys	Pro	Gly	Leu	Tyr	Gly	Tyr	Lys	Tyr		
		1475					1480					1485				
ctt	cta	gtt	ttt	ata	gat	acc	ttt	tct	ggc	tgg	ata	gaa	gcc	ttc		4509
Leu	Leu	Val	Phe	Ile	Asp	Thr	Phe	Ser	Gly	Trp	Ile	Glu	Ala	Phe		
		1490					1495					1500				
cca	acc	aag	aaa	gaa	acc	gcc	aag	gtc	gta	acc	aag	aag	cta	cta		4554
Pro	Thr	Lys	Lys	Glu	Thr	Ala	Lys	Val	Val	Thr	Lys	Lys	Leu	Leu		
		1505					1510					1515				
gag	gag	atc	ttc	ccc	agg	ttc	ggc	atg	cct	cag	gta	ttg	gga	act		4599
Glu	Glu	Ile	Phe	Pro	Arg	Phe	Gly	Met	Pro	Gln	Val	Leu	Gly	Thr		
		1520					1525					1530				
gac	aat	ggg	cct	gcc	ttc	gtc	tcc	aag	gtg	agt	cag	aca	gtg	gcc		4644
Asp	Asn	Gly	Pro	Ala	Phe	Val	Ser	Lys	Val	Ser	Gln	Thr	Val	Ala		
		1535					1540					1545				
gat	ctg	ttg	ggg	att	gat	tgg	aaa	tta	cat	tgt	gca	tac	aga	ccc		4689
Asp	Leu	Leu	Gly	Ile	Asp	Trp	Lys	Leu	His	Cys	Ala	Tyr	Arg	Pro		
		1550					1555					1560				
caa	agc	tca	ggc	cag	gta	gaa	aga	atg	aat	aga	acc	atc	aag	gag		4734
Gln	Ser	Ser	Gly	Gln	Val	Glu	Arg	Met	Asn	Arg	Thr	Ile	Lys	Glu		
		1565					1570					1575				
act	tta	act	aaa	tta	acg	ctt	gca	act	ggc	tct	aga	gac	tgg	gtg		4779
Thr	Leu	Thr	Lys	Leu	Thr	Leu	Ala	Thr	Gly	Ser	Arg	Asp	Trp	Val		
		1580					1585					1590				

ES 2 745 103 T3

ctc cta ctc ccc tta gcc ctg tac cga gcc cgc aac acg ccg ggc 4824
 Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro Gly
 1595 1600 1605

ccc cat ggc ctc acc cca tat gag atc tta tat ggg gca ccc ccg 4869
 Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro Pro
 1610 1615 1620

ccc ctt gta aac ttc cct gac cct gac atg aca aga gtt act aac 4914
 Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr Asn
 1625 1630 1635

agc ccc tct ctc caa gct cac tta cag gct ctc tac tta gtc cag 4959
 Ser Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val Gln
 1640 1645 1650

cac gaa gtc tgg aga cct ctg gcg gca gcc tac caa gaa caa ctg 5004
 His Glu Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln Leu
 1655 1660 1665

gac cga ccg gtg gta cct cac cct tac cga gtc ggc gac aca gtg 5049
 Asp Arg Pro Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr Val
 1670 1675 1680

tgg gtc cgc cga cac cag act aag aac cta gaa cct cgc tgg aaa 5094
 Trp Val Arg Arg His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp Lys
 1685 1690 1695

gga cct tac aca gtc ctg ctg acc acc ccc acc gcc ctc aaa gta 5139
 Gly Pro Tyr Thr Val Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys Val
 1700 1705 1710

gac ggc atc gca gct tgg ata cac gcc gcc cac gtg aag gct gcc 5184
 Asp Gly Ile Ala Ala Trp Ile His Ala Ala His Val Lys Ala Ala
 1715 1720 1725

gac ccc ggg ggt gga cca tcc tct aga ctg aca tgg cgc gtt caa 5229
 Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val Gln
 1730 1735 1740

cgc tct caa aac ccc tta aaa ata agg tta acc cgc gag gcc ccc 5274
 Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile Arg Leu Thr Arg Glu Ala Pro
 1745 1750 1755

taa 5277

<210> 2

<211> 538

<212> PRT

5 <213> Virus de la leucemia murina

<400> 2

Met Gly Gln Thr Val Thr Thr Pro Leu Ser Leu Thr Leu Gly His Trp
 1 5 10 15

Lys Asp Val Glu Arg Ile Ala His Asn Gln Ser Val Asp Val Lys Lys
 20 25 30

Arg Arg Trp Val Thr Phe Cys Ser Ala Glu Trp Pro Thr Phe Asn Val

ES 2 745 103 T3

Glu Ala Arg Lys Ala Val Arg Gly Asp Asp Gly Arg Pro Thr Gln Leu
 290 295 300

Pro Asn Glu Val Asp Ala Ala Phe Pro Leu Glu Arg Pro Asp Trp Asp
 305 310 315 320

Tyr Thr Thr Gln Ala Gly Arg Asn His Leu Val His Tyr Arg Gln Leu
 325 330 335

Leu Leu Ala Gly Leu Gln Asn Ala Gly Arg Ser Pro Thr Asn Leu Ala
 340 345 350

Lys Val Lys Gly Ile Thr Gln Gly Pro Asn Glu Ser Pro Ser Ala Phe
 355 360 365

Leu Glu Arg Leu Lys Glu Ala Tyr Arg Arg Tyr Thr Pro Tyr Asp Pro
 370 375 380

Glu Asp Pro Gly Gln Glu Thr Asn Val Ser Met Ser Phe Ile Trp Gln
 385 390 395 400

Ser Ala Pro Asp Ile Gly Arg Lys Leu Glu Arg Leu Glu Asp Leu Lys
 405 410 415

Asn Lys Thr Leu Gly Asp Leu Val Arg Glu Ala Glu Lys Ile Phe Asn
 420 425 430

Lys Arg Glu Thr Pro Glu Glu Arg Glu Glu Arg Ile Arg Arg Glu Thr
 435 440 445

Glu Glu Lys Glu Glu Arg Arg Arg Thr Glu Asp Glu Gln Lys Glu Lys
 450 455 460

Glu Arg Asp Arg Arg Arg His Arg Glu Met Ser Lys Leu Leu Ala Thr
 465 470 475 480

Val Val Ser Gly Gln Lys Gln Asp Arg Gln Gly Gly Glu Arg Arg Arg
 485 490 495

Ser Gln Leu Asp Arg Asp Gln Cys Ala Tyr Cys Lys Glu Lys Gly His
 500 505 510

Trp Ala Lys Asp Cys Pro Lys Lys Pro Arg Gly Pro Arg Gly Pro Arg
 515 520 525

Pro Gln Thr Ser Leu Leu Thr Leu Asp Asp
 530 535

<210> 3

<211> 1219

<212> PRT

5 <213> Virus de la leucemia murina

ES 2 745 103 T3

<400> 3

Gly Gly Gln Gly Gln Glu Pro Pro Pro Glu Pro Arg Ile Thr Leu Lys
 1 5 10 15

Val Gly Gly Gln Pro Val Thr Phe Leu Val Asp Thr Gly Ala Gln His
 20 25 30

Ser Val Leu Thr Gln Asn Pro Gly Pro Leu Ser Asp Lys Ser Ala Trp
 35 40 45

Val Gln Gly Ala Thr Gly Gly Lys Arg Tyr Arg Trp Thr Thr Asp Arg
 50 55 60

Lys Val His Leu Ala Thr Gly Lys Val Thr His Ser Phe Leu His Val
 65 70 75 80

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

Lys Ala Gln Ile His Phe Glu Gly Ser Gly Ala Gln Val Met Gly Pro
 100 105 110

Met Gly Gln Pro Leu Gln Val Leu Thr Leu Asn Ile Glu Asp Glu His
 115 120 125

Arg Leu His Glu Thr Ser Lys Glu Pro Asp Val Ser Leu Gly Ser Thr
 130 135 140

Trp Leu Ser Asp Phe Pro Gln Ala Trp Ala Glu Thr Gly Gly Met Gly
 145 150 155 160

Leu Ala Val Arg Gln Ala Pro Leu Ile Ile Pro Leu Lys Ala Thr Ser
 165 170 175

Thr Pro Val Ser Ile Lys Gln Tyr Pro Met Ser Gln Glu Ala Arg Leu
 180 185 190

Gly Ile Lys Pro His Ile Gln Arg Leu Leu Asp Gln Gly Ile Leu Val
 195 200 205

Pro Cys Gln Ser Pro Trp Asn Thr Pro Leu Leu Pro Val Lys Lys Pro
 210 215 220

ES 2 745 103 T3

Gly Thr Asn Asp Tyr Arg Pro Val Gln Asp Leu Arg Glu Val Asn Lys
 225 230 235 240

Arg Val Glu Asp Ile His Pro Thr Val Pro Asn Pro Tyr Asn Leu Leu
 245 250 255

Ser Gly Leu Pro Pro Ser His Gln Trp Tyr Thr Val Leu Asp Leu Lys
 260 265 270

Asp Ala Phe Phe Cys Leu Arg Leu His Pro Thr Ser Gln Pro Leu Phe
 275 280 285

Ala Phe Glu Trp Arg Asp Pro Glu Met Gly Ile Ser Gly Gln Leu Thr
 290 295 300

Trp Thr Arg Leu Pro Gln Gly Phe Lys Asn Ser Pro Thr Leu Phe Asp
 305 310 315 320

Glu Ala Leu His Arg Asp Leu Ala Asp Phe Arg Ile Gln His Pro Asp
 325 330 335

Leu Ile Leu Leu Gln Tyr Val Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ala Thr Ser
 340 345 350

Glu Leu Asp Cys Gln Gln Gly Thr Arg Ala Leu Leu Gln Thr Leu Gly
 355 360 365

Asn Leu Gly Tyr Arg Ala Ser Ala Lys Lys Ala Gln Ile Cys Gln Lys
 370 375 380

Gln Val Lys Tyr Leu Gly Tyr Leu Leu Lys Glu Gly Gln Arg Trp Leu
 385 390 395 400

Thr Glu Ala Arg Lys Glu Thr Val Met Gly Gln Pro Thr Pro Lys Thr
 405 410 415

Pro Arg Gln Leu Arg Glu Phe Leu Gly Thr Ala Gly Phe Cys Arg Leu
 420 425 430

Trp Ile Pro Gly Phe Ala Glu Met Ala Ala Pro Leu Tyr Pro Leu Thr
 435 440 445

Lys Thr Gly Thr Leu Phe Asn Trp Gly Pro Asp Gln Gln Lys Ala Tyr
 450 455 460

Gln Glu Ile Lys Gln Ala Leu Leu Thr Ala Pro Ala Leu Gly Leu Pro
 465 470 475 480

ES 2 745 103 T3

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

ES 2 745 103 T3

Lys Leu Leu Glu Glu Ile Phe Pro Arg Phe Gly Met Pro Gln Val Leu
 980 985 990

Gly Thr Asp Asn Gly Pro Ala Phe Val Ser Lys Val Ser Gln Thr Val
 995 1000 1005

Ala Asp Leu Leu Gly Ile Asp Trp Lys Leu His Cys Ala Tyr Arg
 1010 1015 1020

Pro Gln Ser Ser Gly Gln Val Glu Arg Met Asn Arg Thr Ile Lys
 1025 1030 1035

Glu Thr Leu Thr Lys Leu Thr Leu Ala Thr Gly Ser Arg Asp Trp
 1040 1045 1050

Val Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Tyr Arg Ala Arg Asn Thr Pro
 1055 1060 1065

Gly Pro His Gly Leu Thr Pro Tyr Glu Ile Leu Tyr Gly Ala Pro
 1070 1075 1080

Pro Pro Leu Val Asn Phe Pro Asp Pro Asp Met Thr Arg Val Thr
 1085 1090 1095

Asn Ser Pro Ser Leu Gln Ala His Leu Gln Ala Leu Tyr Leu Val
 1100 1105 1110

Gln His Glu Val Trp Arg Pro Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Glu Gln
 1115 1120 1125

Leu Asp Arg Pro Val Val Pro His Pro Tyr Arg Val Gly Asp Thr
 1130 1135 1140

Val Trp Val Arg Arg His Gln Thr Lys Asn Leu Glu Pro Arg Trp
 1145 1150 1155

Lys Gly Pro Tyr Thr Val Leu Leu Thr Thr Pro Thr Ala Leu Lys
 1160 1165 1170

Val Asp Gly Ile Ala Ala Trp Ile His Ala Ala His Val Lys Ala
 1175 1180 1185

Ala Asp Pro Gly Gly Gly Pro Ser Ser Arg Leu Thr Trp Arg Val
 1190 1195 1200

Gln Arg Ser Gln Asn Pro Leu Lys Ile Arg Leu Thr Arg Glu Ala
 1205 1210 1215

Pro

- 5 <210> 4
- <211> 721
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 745 103 T3

<220>

<223> Fragmento de proteína de MLV

<400> 4

Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Thr Cys Cys Cys Ala Gly Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Cys Thr Thr Cys Gly Gly Gly Gly Gly Cys Cys Gly Thr Thr Thr Thr
 20 25 30

Thr Gly Thr Gly Gly Cys Cys Cys Gly Ala Cys Cys Thr Gly Ala Gly
 35 40 45

Thr Cys Cys Ala Ala Ala Ala Ala Thr Cys Cys Cys Gly Ala Thr Cys
 50 55 60

Gly Thr Thr Thr Thr Gly Gly Ala Cys Thr Cys Thr Thr Thr Gly Gly
 65 70 75 80

Thr Gly Cys Ala Cys Cys Cys Cys Cys Cys Thr Thr Ala Gly Ala Gly
 85 90 95

Gly Ala Gly Gly Gly Ala Thr Ala Thr Gly Thr Gly Gly Thr Thr Cys
 100 105 110

Thr Gly Gly Thr Ala Gly Gly Ala Gly Ala Cys Gly Ala Gly Ala Ala
 115 120 125

Cys Cys Thr Ala Ala Ala Ala Cys Ala Gly Thr Thr Cys Cys Cys Gly
 130 135 140

Cys Cys Thr Cys Cys Gly Thr Cys Thr Gly Ala Ala Thr Thr Thr Thr
 145 150 155 160

Thr Gly Cys Thr Thr Thr Cys Gly Gly Thr Thr Thr Gly Gly Gly Ala
 165 170 175

Cys Cys Gly Ala Ala Gly Cys Cys Gly Cys Gly Cys Cys Gly Cys Gly
 180 185 190

ES 2 745 103 T3

Cys Gly Thr Cys Thr Thr Gly Thr Cys Thr Gly Cys Thr Gly Cys Ala
 195 200 205

Gly Cys Ala Thr Cys Gly Thr Thr Cys Thr Gly Thr Gly Thr Thr Gly
 210 215 220

Thr Cys Thr Cys Thr Gly Thr Cys Thr Gly Ala Cys Thr Gly Thr Gly
 225 230 235 240

Thr Thr Thr Cys Thr Gly Thr Ala Thr Thr Thr Gly Thr Cys Thr Gly
 245 250 255

Ala Ala Ala Ala Thr Ala Thr Gly Gly Gly Cys Cys Ala Gly Ala Cys
 260 265 270

Thr Gly Thr Thr Ala Cys Cys Ala Cys Thr Cys Cys Cys Thr Thr Ala
 275 280 285

Ala Gly Thr Thr Thr Gly Ala Cys Cys Thr Thr Ala Gly Gly Thr Cys
 290 295 300

Ala Cys Thr Gly Gly Ala Ala Ala Gly Ala Thr Gly Thr Cys Gly Ala
 305 310 315 320

Gly Cys Gly Gly Ala Thr Cys Gly Cys Thr Cys Ala Cys Ala Ala Cys
 325 330 335

Cys Ala Gly Thr Cys Gly Gly Thr Ala Gly Ala Thr Gly Thr Cys Ala
 340 345 350

Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Cys Gly Thr Thr Gly Gly Gly Thr
 355 360 365

Thr Ala Cys Cys Thr Thr Cys Thr Gly Cys Thr Cys Thr Gly Cys Ala
 370 375 380

Gly Ala Ala Thr Gly Gly Cys Cys Ala Ala Cys Cys Thr Thr Thr Ala
 385 390 395 400

Ala Cys Gly Thr Cys Gly Gly Ala Thr Gly Gly Cys Cys Gly Cys Gly
 405 410 415

Ala Gly Ala Cys Gly Gly Cys Ala Cys Cys Thr Thr Thr Ala Ala Cys
 420 425 430

Cys Gly Ala Gly Ala Cys Cys Thr Cys Ala Thr Cys Ala Cys Cys Cys
 435 440 445

ES 2 745 103 T3

Ala Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Thr Cys Ala Ala Gly Gly Thr
 450 455 460

Cys Thr Thr Thr Thr Cys Ala Cys Cys Thr Gly Gly Cys Cys Cys Gly
 465 470 475 480

Cys Ala Thr Gly Gly Ala Cys Ala Cys Cys Cys Ala Gly Ala Cys Cys
 485 490 495

Ala Gly Gly Thr Cys Cys Cys Cys Thr Ala Cys Ala Thr Cys Gly Thr
 500 505 510

Gly Ala Cys Cys Thr Gly Gly Gly Ala Ala Gly Cys Cys Thr Thr Gly
 515 520 525

Gly Cys Thr Thr Thr Thr Gly Ala Cys Cys Cys Cys Cys Cys Thr Cys
 530 535 540

Cys Cys Thr Gly Gly Gly Thr Cys Ala Ala Gly Cys Cys Cys Thr Thr
 545 550 555 560

Thr Gly Thr Ala Cys Ala Cys Cys Cys Thr Ala Ala Gly Cys Cys Thr
 565 570 575

Cys Cys Gly Cys Cys Thr Cys Cys Thr Cys Thr Thr Cys Cys Thr Cys
 580 585 590

Cys Ala Thr Cys Cys Gly Cys Cys Cys Cys Gly Thr Cys Thr Cys Thr
 595 600 605

Cys Cys Cys Cys Cys Thr Thr Gly Ala Ala Cys Cys Thr Cys Cys Thr
 610 615 620

Cys Gly Thr Thr Cys Gly Ala Cys Cys Cys Cys Gly Cys Cys Thr Cys
 625 630 635 640

Gly Ala Thr Cys Cys Thr Cys Cys Cys Thr Thr Thr Ala Thr Cys Cys
 645 650 655

Ala Gly Cys Cys Cys Thr Cys Ala Cys Thr Cys Cys Thr Thr Cys Thr
 660 665 670

Cys Thr Ala Gly Gly Cys Gly Cys Cys Ala Ala Ala Cys Cys Thr Ala
 675 680 685

Ala Ala Cys Cys Thr Cys Ala Ala Gly Thr Thr Cys Thr Thr Thr Cys
 690 695 700

Thr Gly Ala Cys Ala Gly Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Cys Cys Gly
 705 710 715 720

Cys

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una partícula similar a virus (VLP) que no se replica, no envuelta, que comprende una partícula viral desnuda que consiste en (i) polipéptidos estructurales gag y pol de un gammaretrovirus; y/o (ii) una poliproteína gag-pol gammaretroviral, en donde la VLP carece de un genoma viral, una envoltura de lípido y proteínas de la envoltura.
5
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la VLP comprende uno o más componentes asociados con un gammaretrovirus que bloquea la producción de IFN tipo I.
3. La composición de la reivindicación 2, en donde los componentes inmunosupresores bloquean la activación de receptores tipo Toll (TLR) endosomales en pDC y la posterior inducción de la producción de IFN tipo I.
- 10 4. Una composición que comprende una VLP de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y que además comprende un agente inmunosupresor adicional.
5. La composición de la reivindicación 4, en donde el agente inmunosupresor adicional es un anticuerpo anti-IFN α o fragmento del mismo.
6. La composición de la reivindicación 4, en donde el agente inmunosupresor adicional es un esteroide.
- 15 7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para usar en terapia.
8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para usar en el tratamiento de un trastorno autoinmunitario mediado por interferón tipo I, seleccionado del grupo que consiste en artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, escleroderma, polimiositis, dermatomiositis, espondilitis anquilosante y síndrome de Sjogren.
- 20 9. Una composición para usar según la reivindicación 8, en donde el trastorno inmunitario es lupus eritematoso sistémico.

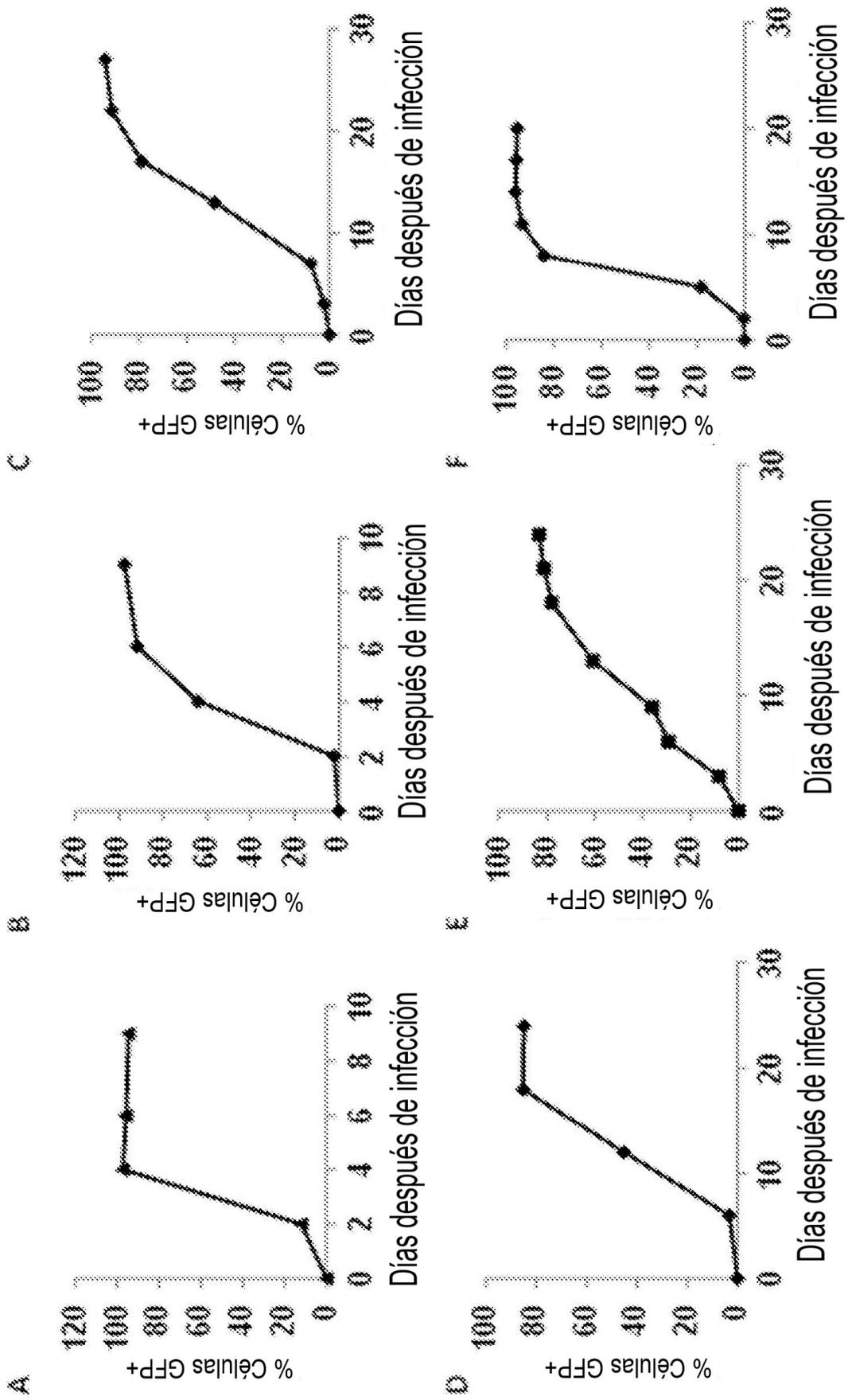


FIGURA 1A-F

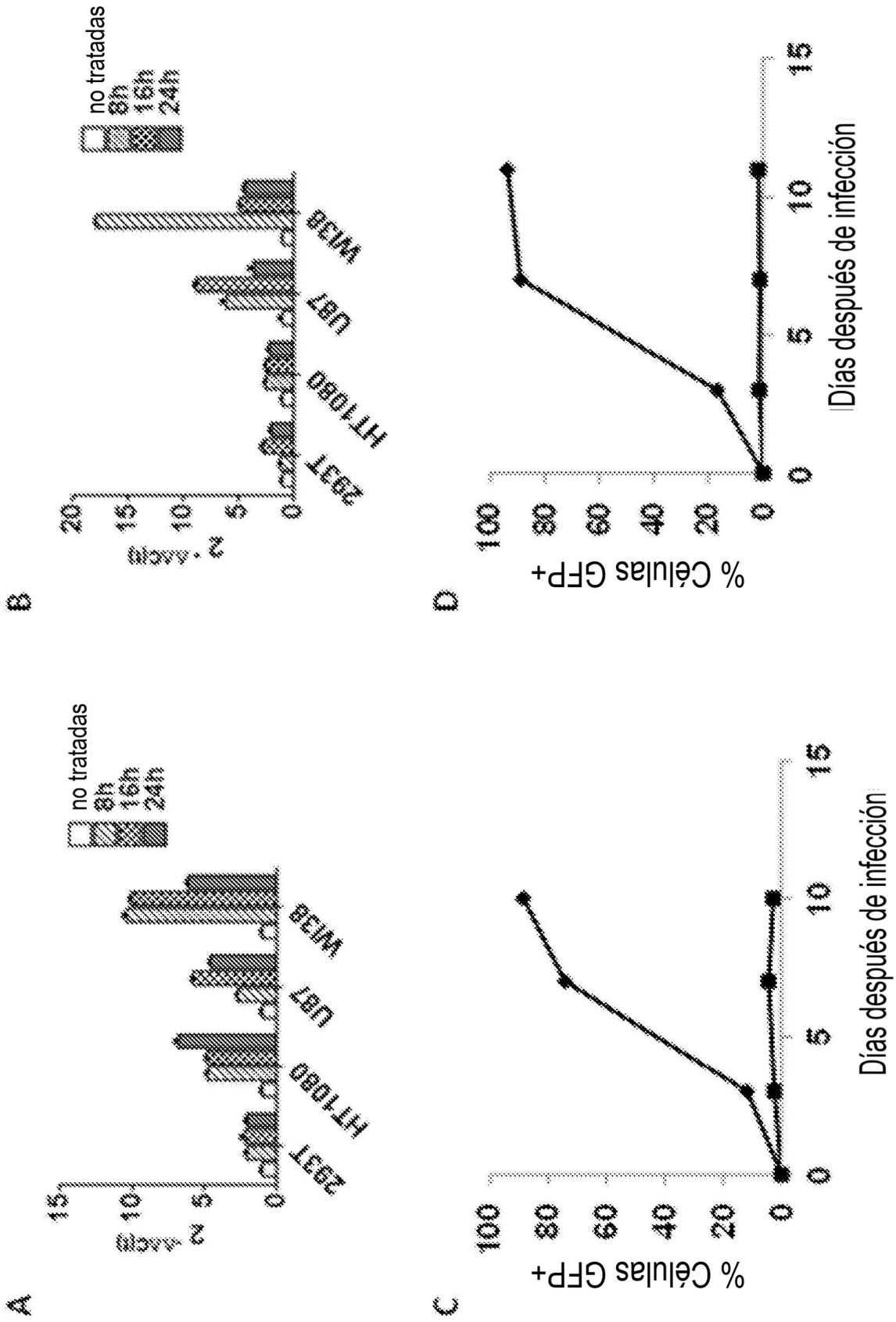


FIGURA 2A-D

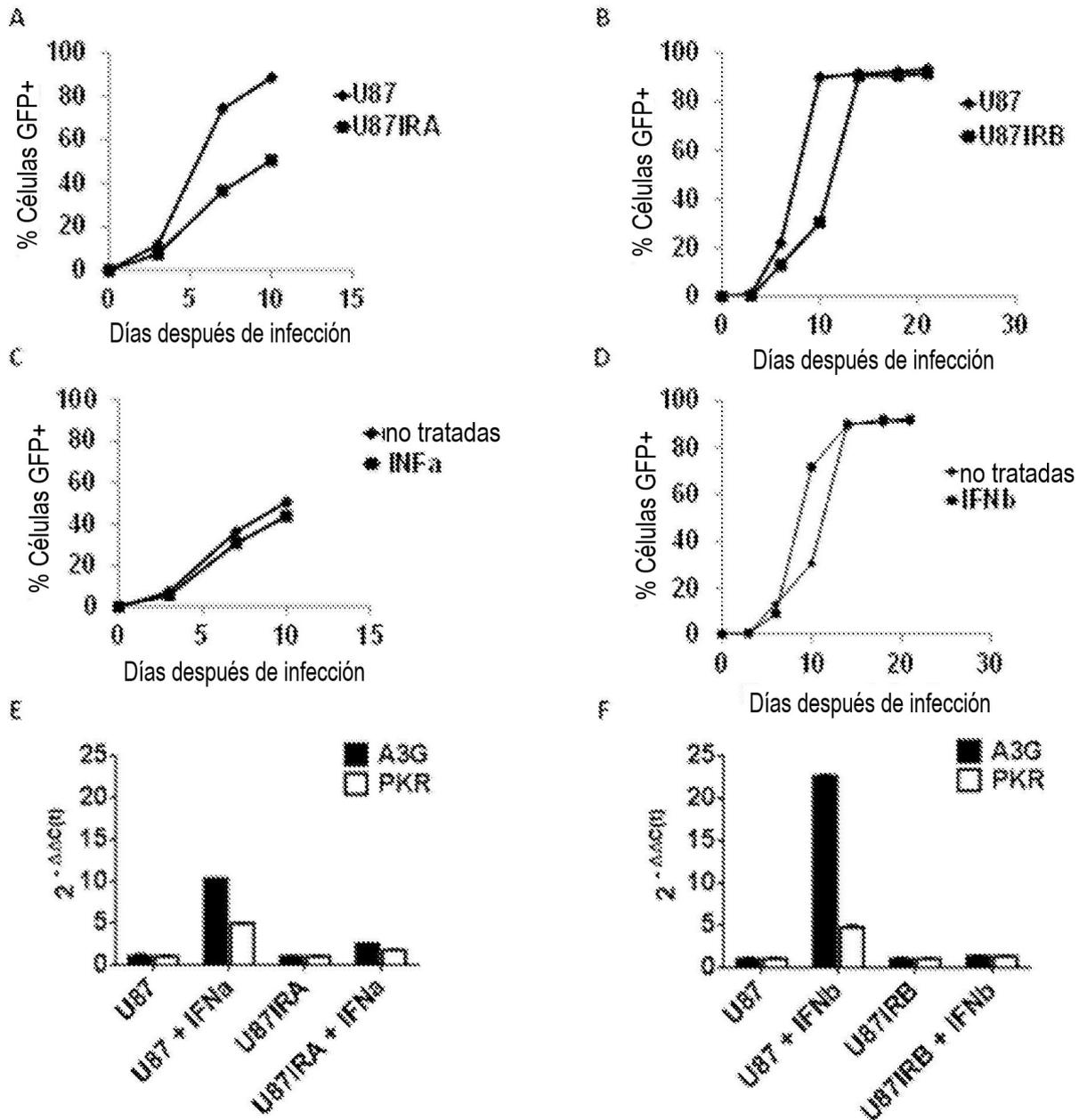


FIGURA 3A-F

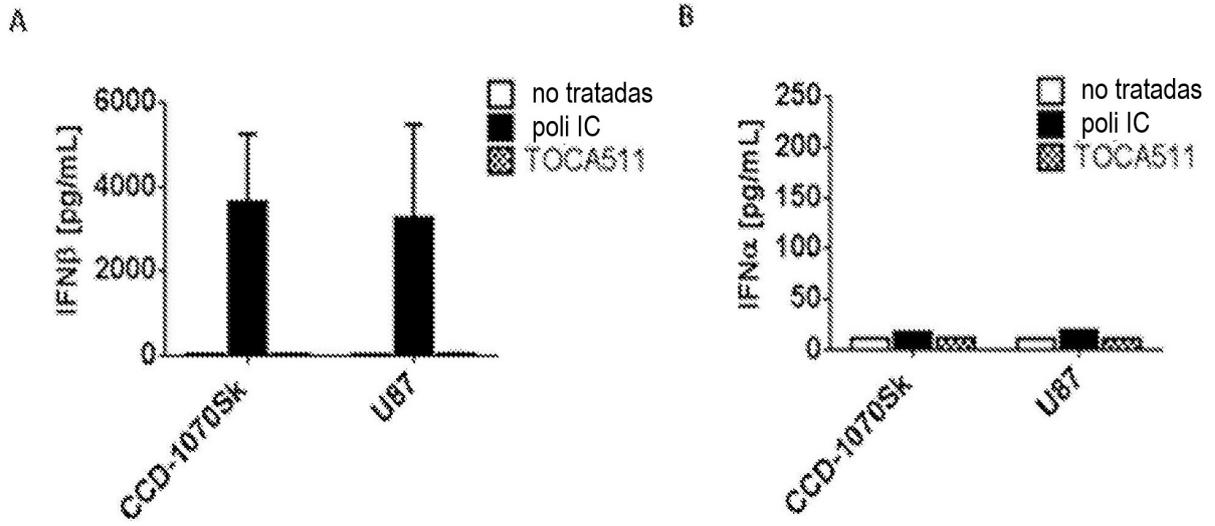


FIGURA 4A-B

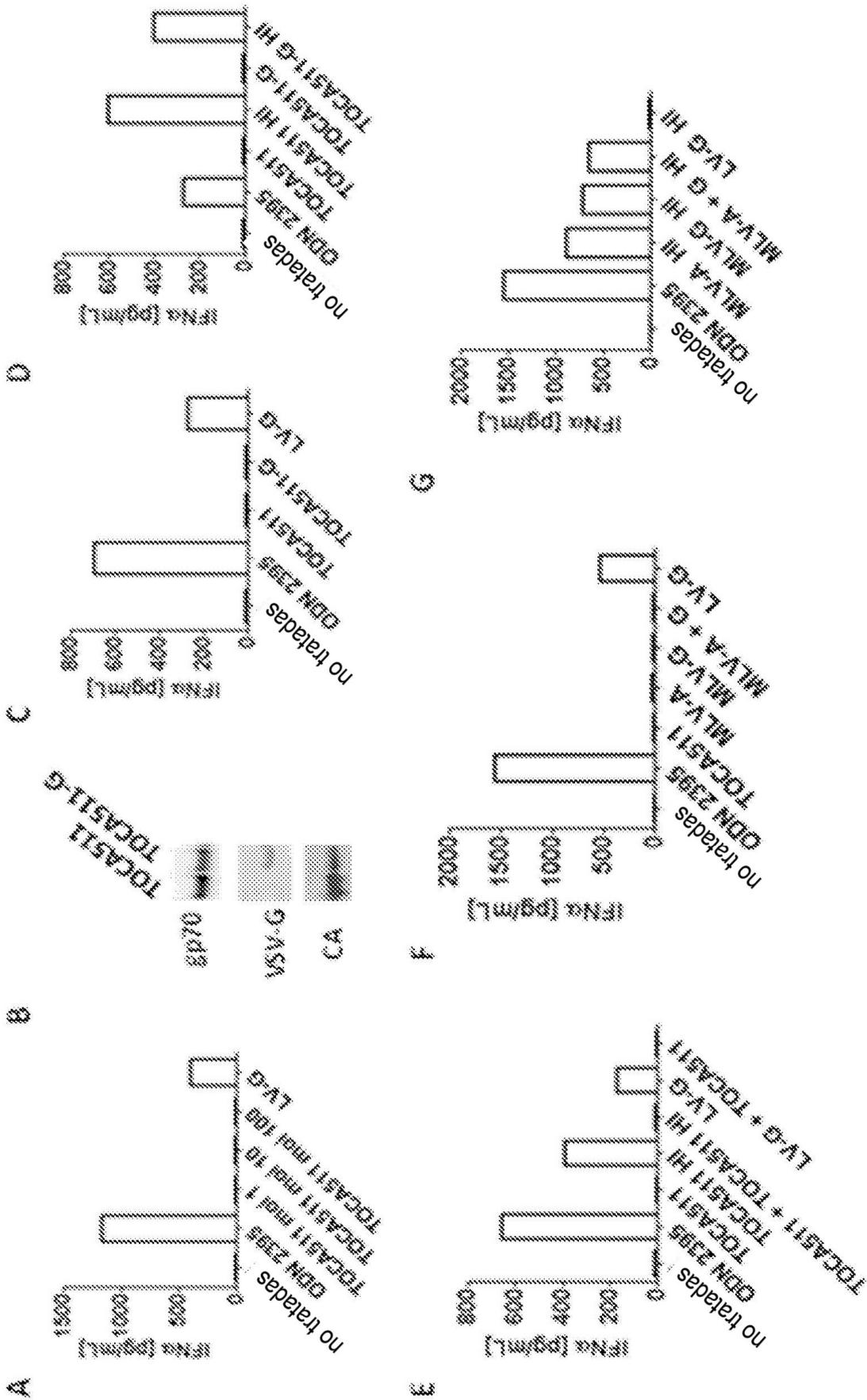


FIGURA 5A-G

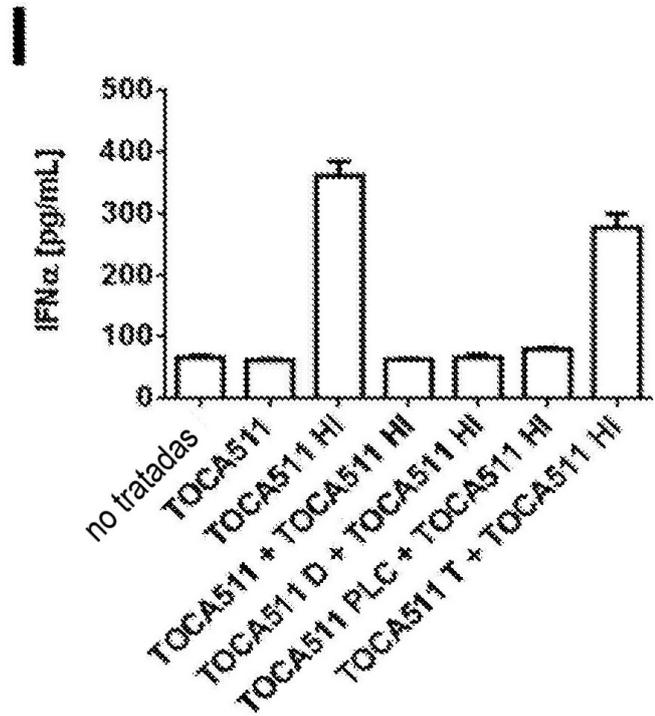
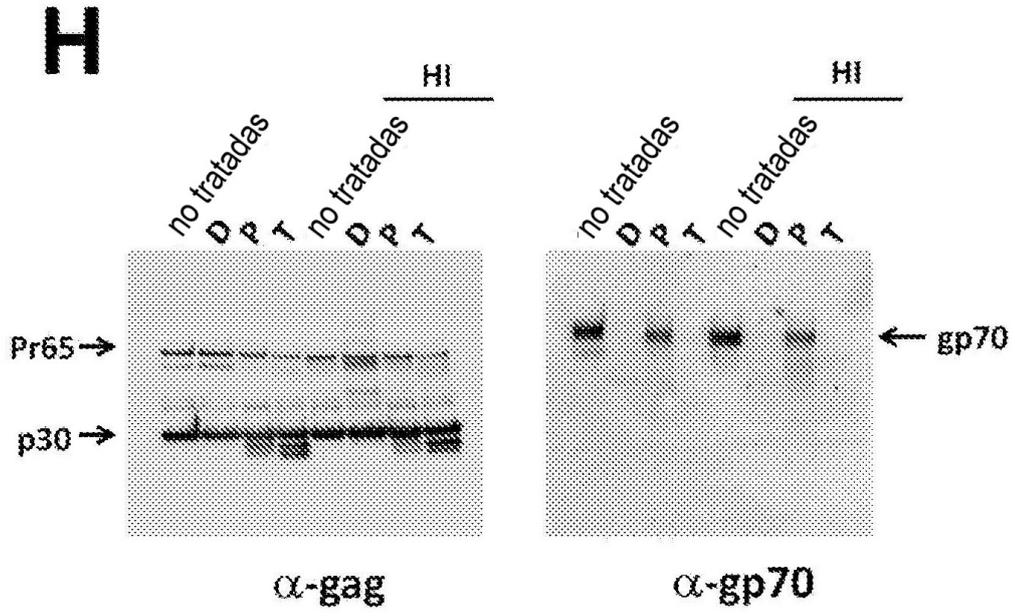


FIGURA 5H-I

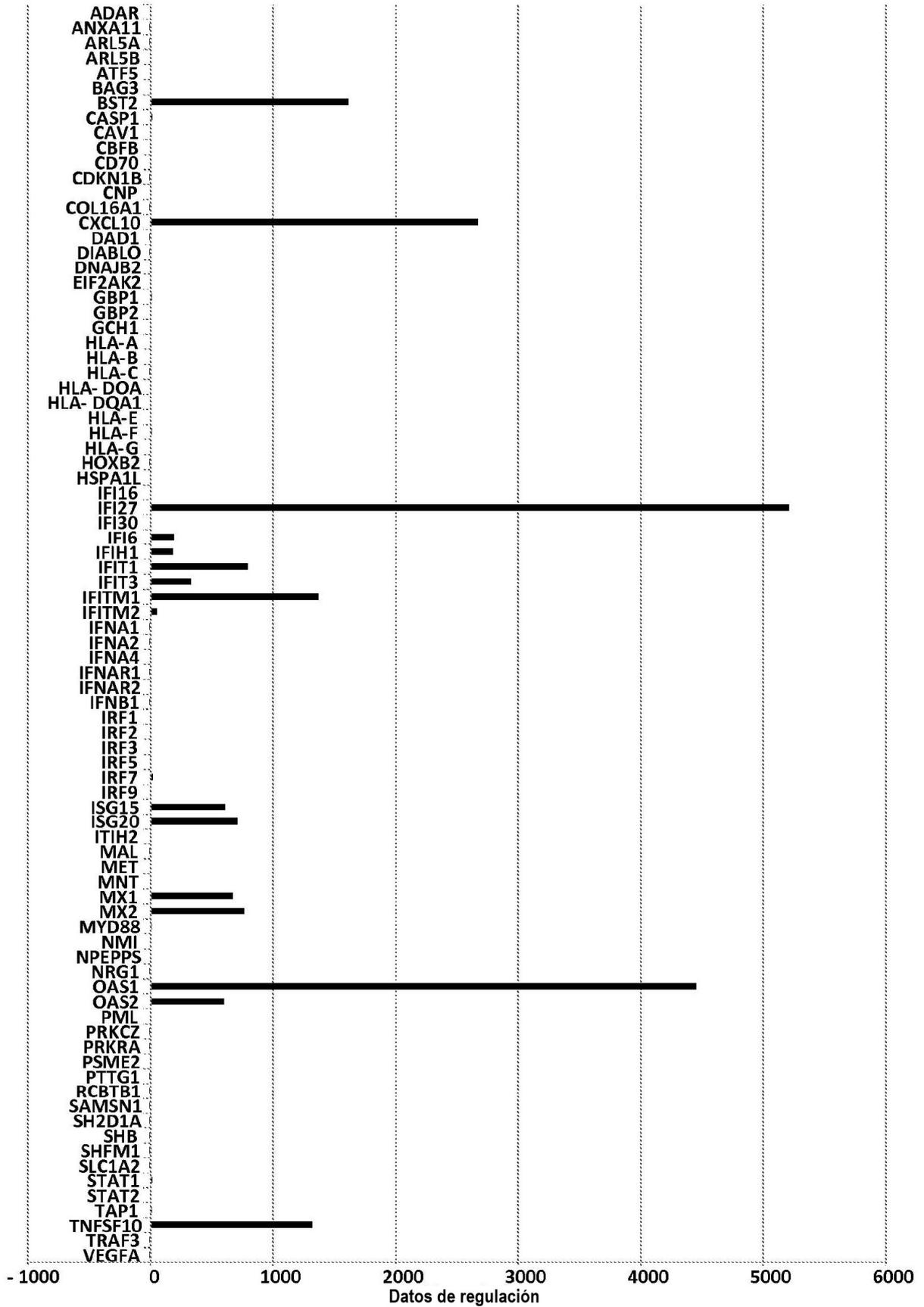


FIGURA 6A

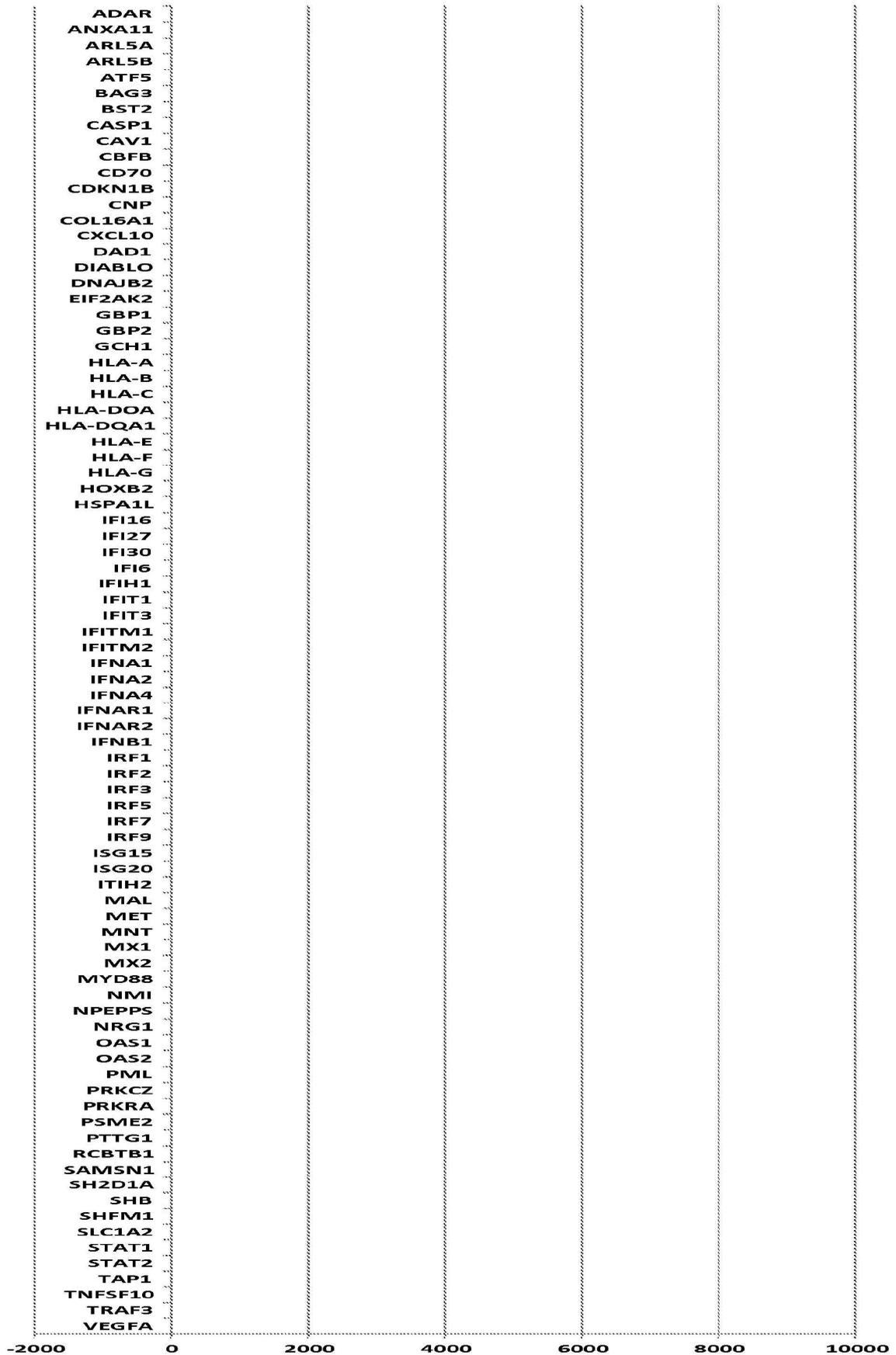


FIGURA 6B

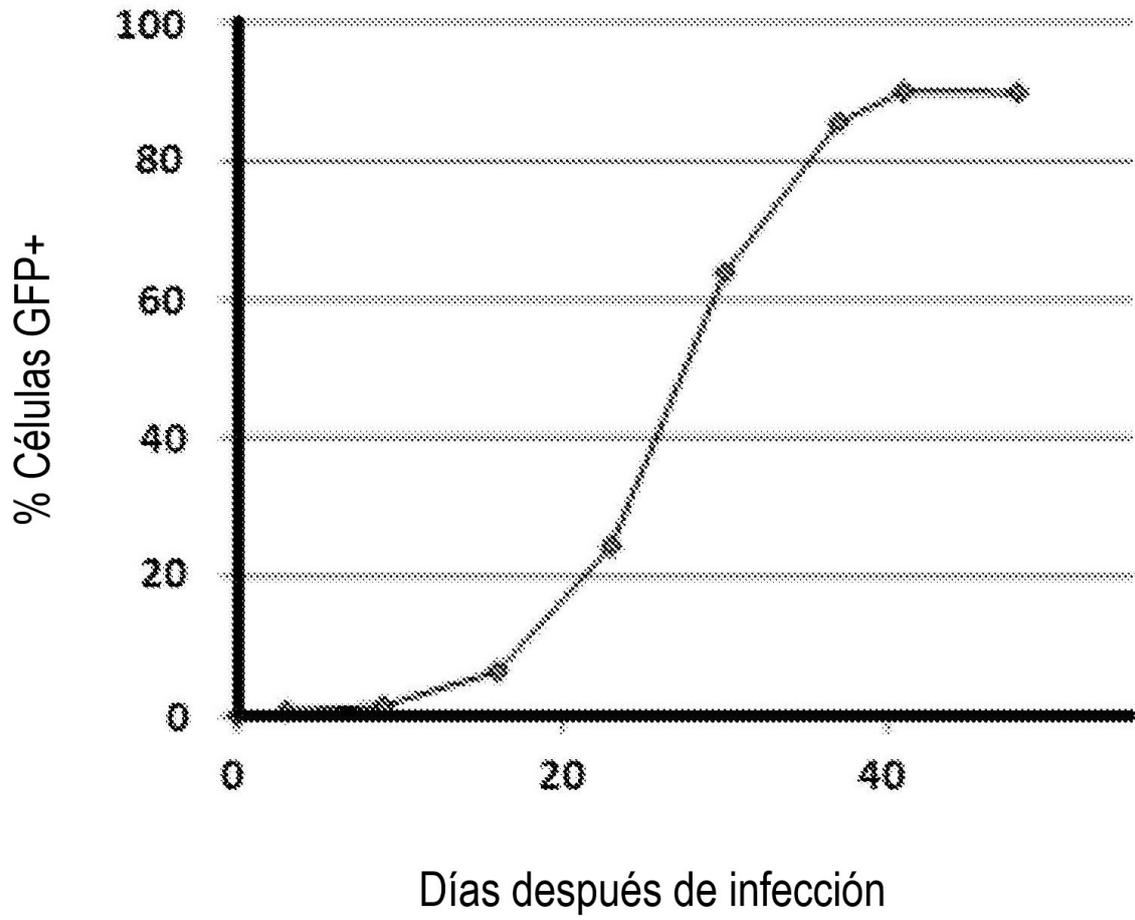
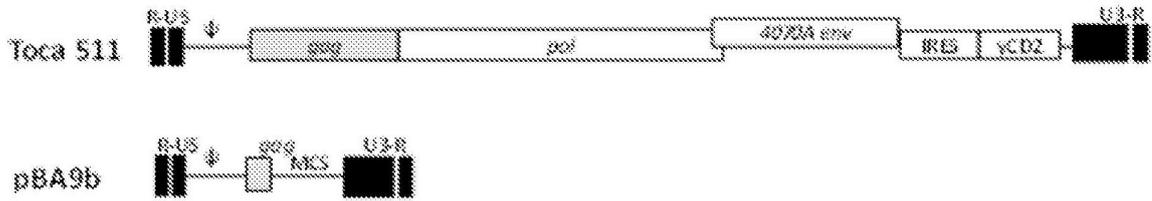


FIGURA 7

A



B

GGAGACGTCCCAGGGACTTCGGGGGCCGTTTGTGGCCCGACCTGAGTC
AspII
 CAAAAATCCGATCGTTTGGACTCTTGGTGCACCCCTTAGAGGAGG
 GATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAACC TAAAACAGTTCCCGCC TCCG
 TCTGAAATTTTTCCTTTCGGTTTGGGACCGAAGCCGCCGCCGCGTCTTGT
 CTGCTGCAGCATCGTTCTGTGTTGTCCTGTCTGACTGTGTTCTGTATT
 TGTCTGAAAATATGGGCCAGACTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTA
 GGTCACTGGAAAGATGTCGAGCGGATCGCTCACAAACAGTCGGTAGATGT
 CAAGAAGA GACGTTGGGTTACCTTCTGCTCTGCAGAATGGCCAACCTTTA
 ACCGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACTTTAACCGAGACCTCATCACCCAG
 GTTAA GATCAAAGTCTTTTCACTGGCCCGCATGGA CACCCAGACCAGGT
 CCCCTACA TCGTGA CCGGGAAGCCTTGGCTTTTGA CCCCTCCCTGGGT
 CAAGCCCTTTGTACACC TAAAGCC TCCGCC TCCCTCTTCCATCCGCCCC
 GTCTCTCC CCCCTTGAACC TCC TCGTTC GAC CCCGCC TCGATC CTCCCTTTA
 TC CAGCCC TCACTCCTTC TCTAGGCGC CAAACC TAAACC TCAAGTCTTTC
 TGACAGTGGGGGCCCGC

FIGURA 8A-B

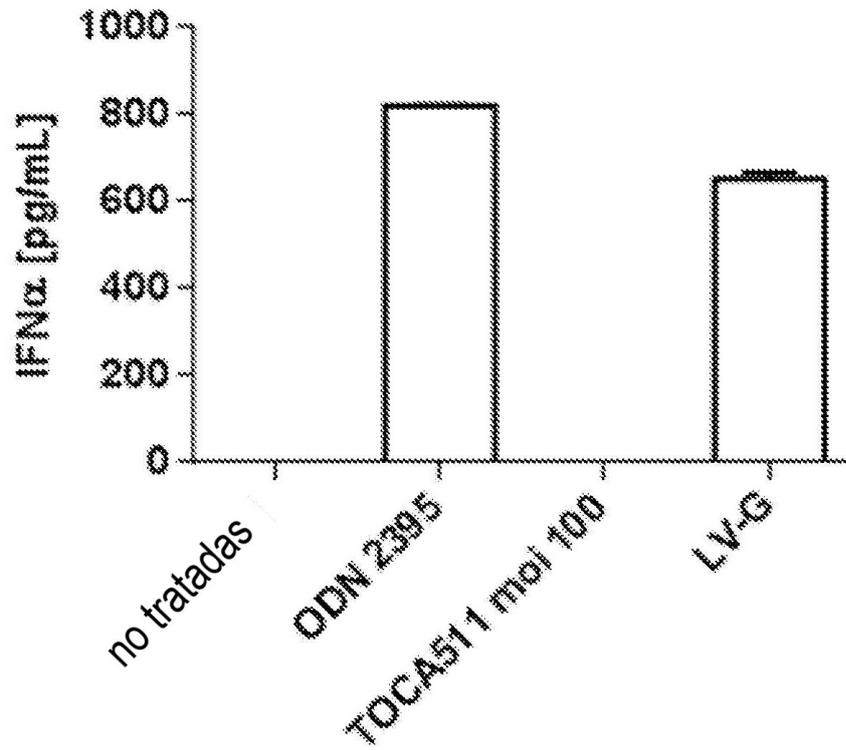


FIGURA 9

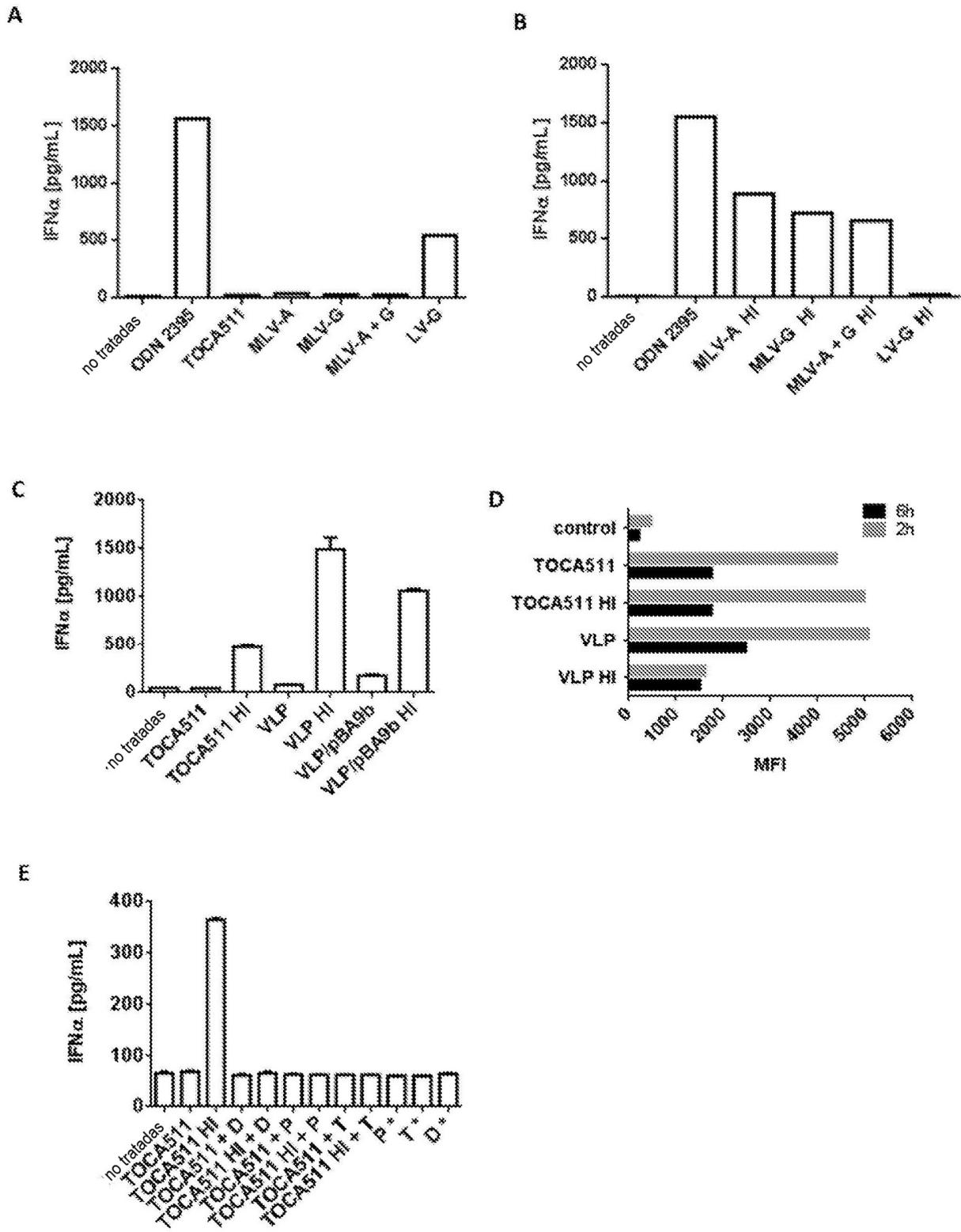


FIGURA 10A-E

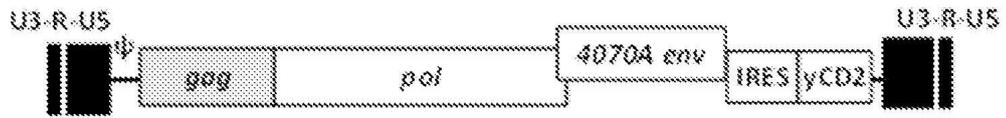


FIGURA 11A

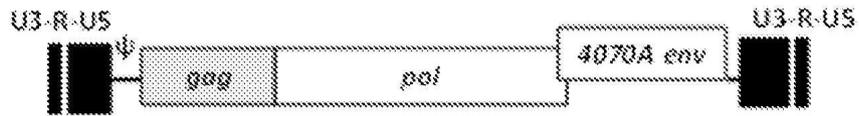


FIGURA 11B

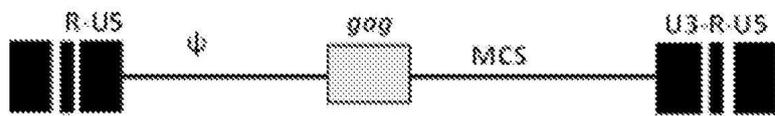


FIGURA 11C

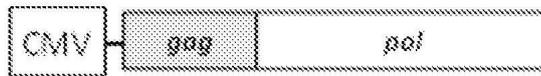


FIGURA 11D

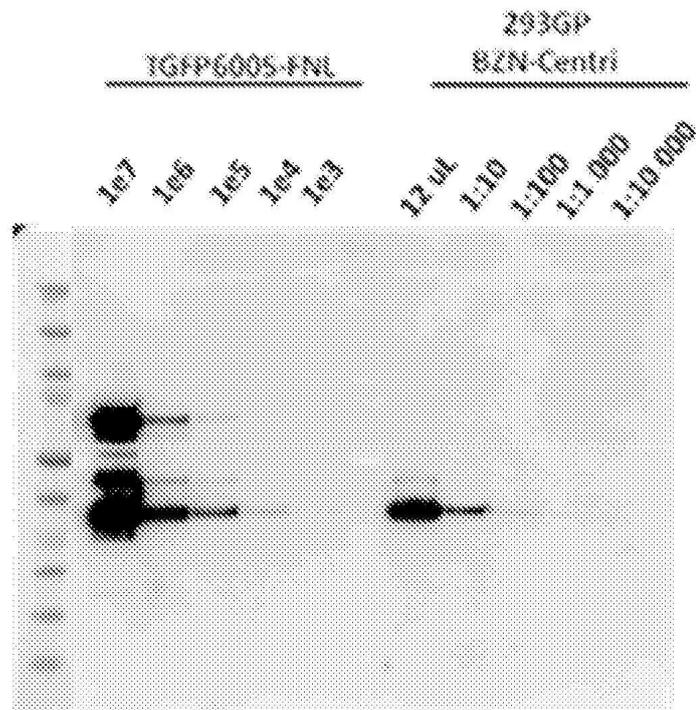


FIGURA 11E