

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 785 503**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2016 PCT/US2016/060968**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2017 WO17083291**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2016 E 16802193 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 3374374**

54 Título: **Composiciones que comprenden vectores lentivíricos que expresan IL-12 y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

09.11.2015 US 201562252877 P
01.12.2015 US 201562261655 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.10.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

TER MEULEN, JAN, HENRIK;
BERGLUND, PETER, LARS AKSEL y
ALBERSHARDT, TINGLAN, TINA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 785 503 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

Composiciones que comprenden vectores lentivíricos que expresan IL-12 y métodos de uso de los mismos

5 Campo técnico

La presente solicitud de patente se refiere generalmente al tratamiento del cáncer, y más particularmente al lentivirus pseudotipado que expresa IL-12 para su uso en un método de tratamiento del cáncer.

10 Antecedentes

Las células cancerosas expresan antígenos. A pesar de la presencia de tales antígenos, los tumores generalmente no son fácilmente reconocidos y eliminados por el hospedador, tal como se demuestra el desarrollo de la enfermedad. La incapacidad del sistema inmunitario para proteger contra los tumores puede deberse a mecanismos de evasión, supresión activa o activación subóptima de la respuesta.

Las citocinas son parte integral del sistema inmunitario innato y del adquirido. Pueden alterar el equilibrio de las respuestas celulares y humorales, alterar el cambio de clase de linfocitos B y modificar las respuestas innatas.

20 La interleucina-12 es una citocina heterodimérica con múltiples efectos biológicos sobre el sistema inmunitario. Se compone de dos subunidades, p35 y p40, ambos necesarios para la secreción de la forma activa de IL-12, p70. La interleucina-12 actúa sobre las células dendríticas (CD), que conduce a una mayor maduración y presentación de antígeno, que puede permitir el inicio de una respuesta de linfocitos T a antígenos tumorales específicos. También impulsa la secreción de IL-12 por CD, creando un mecanismo de retroalimentación positiva para amplificar la respuesta. Una vez que se inicia una respuesta, la IL-12 juega un papel fundamental en la dirección del sistema inmunitario hacia un perfil de citocinas de Th1, induciendo a los linfocitos T CD4 + a secretar interferón gamma (IFN- γ) y dando lugar a una respuesta de linfocitos T CD8+ citotóxicos (véase, por ejemplo, Cancer Immunol Immunother (2014) 63:419-435). Sin embargo, la IL-12 también es una fuerte citocina proinflamatoria que lleva a la secreción de otras citocinas, incluido el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que, combinado con IFN- γ , es un requisito previo para el desarrollo de linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés) CD4 + (Sasiain, M. C., et al. (1998) Clinical and experimental immunology 114: 196-203). Además, la IL-12 puede promover la activación de células inmunes innatas como los macrófagos y los eosinófilos a través de su inducción de IFN γ y otras citocinas. Esta activación lleva a la secreción de IL-12 por estas células y a una mayor amplificación de las respuestas tanto innatas como adquiridas (Portielje, J. E., et al., (2003) Cancer Immunol Immunother 52: 133-144.). Sin embargo, los altos niveles de IL-12 y, en consecuencia, de IFN γ , también se han asociado con la inducción de moléculas antagonistas tales como IL-10 y el agotamiento de las moléculas de señalización aguas abajo de IL-12, tales como STAT4 (Portielje, J. E., et al. (2003) Clin Cancer Res 9: 76-83; Sacco, S., et al. (1997) Blood 90: 4473-4479; Leonard, J. P., et al. (1997) Blood 90: 2541-2548.).

40 La inyección directa de IL-12 recombinante se ha demostrado en algunos modelos de leucemia en ratones (Masztalerz, A., et al., (2003) Cancer Immunol Immunother 52: 235-242; Zagodzón, R., et al. (1998) Int J Cancer 77: 720-727; Tatsumi, T., et al. (2001) Cancer research 61: 7563-7567; Nastala, C. L., et al. (1994) J Immunol 153: 1697-1706; Dunussi-Joannopoulos, K., et al., (1999) Blood 94: 4263-4273.). Si bien los ensayos iniciales en humanos que emplearon este enfoque fueron menos prometedores (Atkins, M. B., et al. (1997) Clin Cancer Res 3: 409-417; Kang, W. K., et al. (2001) Human gene therapy 12: 671-684; Mazzolini, G., et al. (2005) J Clin Oncol 23: 999-1010; Dohnal, A. M., et al., (2007) Cytotherapy 9: 755-770.). Las nuevas estrategias de terapia génica pueden acelerar el desarrollo de inmunoterapia profiláctica contra el cáncer.

50 El documento WO2011/011584 desvela una composición que comprende una partícula de vector lentivírico dirigida a células dendríticas. Este documento no describe una composición que comprende una partícula de vector lentivírico dirigida a células dendríticas en la que la partícula comprende un genoma de vector lentivírico que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la IL-12, para su uso en el tratamiento del cáncer en donde la composición se administra por vía intratumoral.

55 Tatsumi et al (2003) (Cancer Research, Vol. 63, 1 de octubre) desvela el suministro intratumoral de células dendríticas diseñadas para secretar IL-12 e IL-18 para el tratamiento del cáncer. Las células dendríticas están diseñadas por adenovirus. Dicho documento no se encuentra cerca de las células dendríticas diana *in vivo*, y mucho menos con un vector lentivírico.

60 Chen et al. 2001 (Gene Therapy, Vol 8, N.º 4) desvela la cotransducción *ex vivo* de células dendríticas con el vector de adenovirus que codifica la IL-12 (p. 317, colum. izquierda, párr. 2). Los ratones se vacunan con las células dendríticas, no con un vector, y mucho menos un vector lentivírico.

Sumario de la invención:

65 Un aspecto de la presente invención proporciona una composición que comprende una partícula de vector lentivírico

dirigida a células dendríticas en la que la partícula comprende un genoma de vector lentivírico que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la IL-12, para su uso en el tratamiento del cáncer en donde la composición se administra por vía intratumoral.

- 5 Otro aspecto de la presente invención proporciona un producto que comprende: (a) una primera composición, una partícula de vector lentivírico de direccionamiento a células dendríticas que comprende un genoma de vector lentivírico que comprende una secuencia que codifica la IL-12; y (b) una segunda composición que comprende una segunda partícula del vector lentivírico que codifica un antígeno tumoral; para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un sujeto en el que la primera composición se administra por vía intratumoral y la segunda composición se administra por una vía diferente.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una partícula de vector lentivírico que comprende:

- 15 a. una envoltura que comprende una glicoproteína E2 del virus Sindbis de la SEQ ID NO: 1 en la que 160X está ausente o es un aminoácido distinto del ácido glutámico, o una variante de la SEQ ID NO: 1 que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 y en el que 160X está ausente o es un aminoácido distinto del ácido glutámico, capaz de infectar células dendríticas; en donde E2 no es parte de una proteína de fusión con el virus Sindbis E3; y
- 20 b. un genoma del vector lentivírico que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la IL-12.

Otros aspectos y realizaciones de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

- 25 La Figura 1A y la Figura 1B muestran que la coadministración de VP02/IL-12 con VP02/NY-ESO-1 mejora la respuesta de linfocitos T CD8 anti-NY-ESO-1.
La Figura 2A y la Figura 2B muestran que la coadministración de VP02/IL-12 con VP02/hCAIX mejora la respuesta de los linfocitos T CD8 anti-hCAIX.
- 30 La Figura 3A y la Figura 3B muestran que la coadministración de VP02/IL-12 mejora significativamente las respuestas de linfocitos T CD8 específicas de antígeno contra NY-ESO-1 inducidas por el vector lentivírico VP02/NY-ESO-1.
La Figura 4A y la Figura 4B muestran que la coadministración de VP02/IL-12 mejora significativamente las respuestas de linfocitos T CD4 específicas de antígeno contra NY-ESO-1 inducidas por el vector lentivírico VP02/NY-ESO-1.
- 35 La Figura 5A, la Figura 5B, la Figura 5C y la Figura 5D muestran que la coadministración de dosis incluso bajas de VP02/IL-12 (dosis 1E9 vg) con LV305 a dosis inmunogénica límite (1E9 vg) mejoró las respuestas de CD8 y CD4.
La Figura 6 muestra que la coadministración de VP02/IL12 mejoró la actividad terapéutica de dosis altas de VP02/hCAIX, pero la diferencia no fue significativa.
- 40 La Figura 7A y la Figura 7B muestran que la eficacia antitumoral mediada por dosis bajas de LV305 se mejoró significativamente mediante la mezcla de anuncios con VP02/IL-12 y la eficacia antitumoral se correlacionó con la magnitud de los linfocitos T CD8 específicos de NY-ESO-1 (Figura 7B).
La Figura 8A y la Figura 8B muestran que VP02/IL-23 fue capaz de mejorar significativamente las respuestas de linfocitos T CD8 inducidas por LV305 en PBMC después de una inmunización de cebado (Figura 8B).
- 45 La Figura 9A y la Figura 9B muestran la eficacia antitumoral de la inyección intratumoral de LV/IL-12 en un modelo de tumor murino de almohadilla plantar B16F10. La Figura 9A muestra curvas de crecimiento tumoral y la Figura 9B muestra curvas de supervivencia de un vector lentivírico integrante (LV703) y deficiente en integración (LV704, también denominado VP02).
- 50 La Figura 10A y la Figura 10B muestran la eficacia antitumoral de la inyección intratumoral de LV/IL-12 en un modelo de tumor de murino B16F10 en flanco. La Figura 10A muestra curvas de crecimiento tumoral y la Figura 10B muestra curvas de supervivencia de un vector lentivírico integrante (LV703) y deficiente en integración (LV704, también denominado VP02).
- 55 La Figura 11A y la Figura 11B muestran la eficacia antitumoral de la inyección intratumoral de LV/IL-12 en un modelo de tumor murino P815. La Figura 11A muestra curvas de crecimiento tumoral y la Figura 11B muestra curvas de supervivencia de un vector lentivírico integrante (LV703) y deficiente en integración (LV704, también denominado VP02).
- 60 La Figura 12A y la Figura 12B muestran la eficacia antitumoral de la inyección intratumoral de LV/IL-12 en un modelo de tumor de murino CT26 en flanco. La Figura 12A muestra curvas de crecimiento tumoral y la Figura 12B muestra curvas de supervivencia de un vector lentivírico integrante (LV703) y deficiente en integración (LV704, también denominado VP02).
- 65 La Figura 13A y la Figura 13B muestran la eficacia antitumoral de la inyección intratumoral de LV/IL-12 en un modelo de tumor murino 4T1. La Figura 13A muestra curvas de crecimiento tumoral y la Figura 13B muestra curvas de supervivencia de un vector lentivírico integrante (LV703) y deficiente en integración (LV704, también denominado VP02).
- La Figura 14A y la Figura 14B muestran la eficacia antitumoral de la inyección intratumoral de LV/IL-12 en un modelo de tumor murino A20. La Figura 14A muestra curvas de crecimiento tumoral y la Figura 14B muestra

curvas de supervivencia de un vector lentivírico integrante (LV703) y deficiente en integración (LV704, también denominado VP02).

La Figura 15A y la Figura 15B muestran que la adición de VP02/IL-12 aumentó significativamente las respuestas de linfocitos T CD4 específicas de Ag de NY-ESO-1 cuando se administró conjuntamente con rNY-ESO-1 + GLA-SE mezclado y administrado s.c. en la base de la cola. La Figura 15A muestra el porcentaje de linfocitos T CD4 positivos para citocinas y la Figura 15B muestra el porcentaje total de linfocitos T IFN γ CD4 positivos.

La Figura 16A, la Figura 16B, la Figura 16C y la Figura 16D muestran que la adición de VP02/IL-12 aumentó significativamente las respuestas de los linfocitos T CD8 (Figura 16A y Figura 16B) pero disminuyó las respuestas de los linfocitos T CD4 (Figura 16C y Figura 16D) en experimentos que usan antígeno de superficie de hepatitis B recombinante (rHBsAg) en combinación con GLA-SE.

Figura 17A, 17B, 17C: se inocularon ratones hembra C57BL/6 (n = 8/grupo) con 1×10^6 células de melanoma B16F10 en la almohadilla de la pata derecha. El día 7, los ratones con tumor fueron inoculados con 1×10^6 células de melanoma en la almohadilla de la pata izquierda. Los ratones se inmunizaron luego con un LV/IL-12 integrante (LV703) o LV703/IL-12/RTmut o vector de control, IT \pm 200 μ g de anticuerpo anti-CTLA-4 o control de isotipo, IP. El anticuerpo se administró una vez por semana, hasta el final del estudio. 17A, crecimiento tumoral individual; 17B crecimiento tumoral abscopal individual; 17C, Proporciones de supervivencia.

Figura 18A, 18B, 18C: se inocularon ratones hembra C57BL/6 (n = 8/grupo) con 1×10^5 células de melanoma B16F10 en el flanco derecho. El día 7, los ratones con tumor fueron inoculados con 1×10^5 células de melanoma en el flanco izquierdo. Los ratones fueron inmunizados con LV703/IL-12 o LV703/IL-12/RTmut o vector de control, IT \pm 200 μ g de anticuerpo anti-CTLA-4 o control de isotipo, IP. El anticuerpo se administró una vez por semana, hasta el final del estudio. 18A, crecimiento tumoral individual; 18B crecimiento tumoral abscopal individual; 18C, proporciones de supervivencia.

Figura 19A, 19B, 19C, 19D: los ratones BALB/c ratones hembra (n = 10/grupo) fueron inoculados ortotópicamente con 1×10^5 células de cáncer de mama 4T1 dentro de la 4^a almohadilla derecha de grasa mamaria. El día 7, los ratones con tumor fueron inoculados ortotópicamente con 1×10^5 células de cáncer de mama 4T1 dentro de la 4^a almohadilla izquierda de grasa mamaria. Los ratones fueron inmunizados con LV703/IL-12 o vector de control, IT \pm GLA, IT \pm 200 μ g de anticuerpo anti-CTLA-4 o control de isotipo, IP. La primera dosis de GLA fue de 5 μ g de GLA-AF, mezclado con LV703/IL-12, antes de la administración intratumoral. Las dosis posteriores de GLA intratumoral fueron 5 μ g de GLA-SE, administrado semanalmente. 19A, crecimiento tumoral individual primario; 19B, crecimiento tumoral primario individual en animales con tumores abscopales adicionales; 19C, crecimiento tumoral abscopal individual; 19D, Proporciones de supervivencia.

Las Figuras 20A y 20B son gráficos que muestran los niveles plasmáticos de IL-12 e IFN γ en ratones tratados con LV703/IL-12 intratumoral. La Figura 21 representa gráficamente el tamaño del tumor individual (modelo de flanco B16F10) en ratones tratados con LV703/IL-12 y el agotamiento de diferentes tipos de células: (21A): agotamiento de linfocitos T CD8; (21B): agotamiento de linfocitos T CD4; (21C): agotamiento de células NK; (21D): agotamiento de CD8 + CD4 y CD8, agotamiento de CD4 + NK; (21E): agotamiento de CD8 + NK y CD4 + NK.

40 Descripción detallada

La presente divulgación proporciona métodos y composiciones para tratar el cáncer mediante la administración de vectores lentivíricos que codifican la IL-12. En determinadas realizaciones, los vectores lentivíricos son vectores lentivíricos dirigidos a células dendríticas (CD) que expresan la IL-12. En realizaciones particulares, las partículas del vector lentivírico comprenden una variante de glicoproteína de envoltura derivada del virus Sindbis E2, y un genoma que comprende la secuencia que codifica la IL-12, y opcionalmente otros componentes. La variante de glicoproteína presenta una unión reducida al heparán sulfato en comparación con la HR, una cepa de referencia del virus Sindbis. La glicoproteína de la envoltura facilita la infección de las células dendríticas por las partículas del vector lentivírico. "Facilita" la infección, tal como se usa en el presente documento, es lo mismo que facilita la transducción y se refiere al papel de la glicoproteína de la envoltura, actuando solo o junto con otras moléculas, en promover o mejorar la entrada mediada por receptor de un retrovirus pseudotipado o partícula de lentivirus en una célula diana.

En general, las partículas del vector lentivírico se produce por una línea celular que contiene uno o más vectores plasmídicos y/o elementos integrados que codifican juntos los componentes necesarios para generar partículas funcionales del vector. Estas partículas del vector lentivírico generalmente no son competentes en replicación, es decir, solo son capaces de una sola ronda de infección. Con mucha frecuencia, se utilizan múltiples vectores plasmídicos o casetes de expresión individuales integrados de manera estable en el cromosoma de la célula productora para separar los diversos componentes genéticos que generan las partículas del vector lentivírico, sin embargo, se puede usar un solo vector plasmídico que tiene todos los componentes lentivíricos. En un ejemplo, la línea celular de empaquetamiento se transfecta con uno o más plásmidos que contienen el genoma del vector vírico, incluidos los LTR, una secuencia de empaquetamiento de acción cis y la(s) secuencia(s) de interés, al menos un plásmido que codifica los componentes enzimáticos y estructurales del virus (por ejemplo, gag y pol), y al menos un plásmido que codifica una glicoproteína de la envoltura. En determinadas realizaciones, la proteína de envoltura es una glicoproteína de envoltura de Arbovirus. En otras realizaciones, la proteína de la envoltura proviene de un virus heterólogo al virus utilizado para el genoma (por ejemplo, la glicoproteína de la envoltura proviene de un virus que no es un vector lentivírico). Las partículas víricas surgen a través de la membrana celular y comprenden un núcleo que

incluye normalmente dos genomas de ARN abandonados que contienen la secuencia de interés y una glicoproteína de la envoltura, tal como una envoltura de Arbovirus que se dirige a las células dendríticas. Cuando la glicoproteína de Arbovirus es una glicoproteína E2 del virus Sindbis, la glicoproteína está diseñada para reducir la unión al heparán sulfato en comparación con la cepa de referencia HR. Esto generalmente implica al menos un cambio de aminoácidos en comparación con la secuencia de glicoproteína E2 de la HR.

Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la unión de la partícula vírica a la superficie celular induce endocitosis, llevando el virus a un endosoma, desencadenando la fusión de la membrana y permitiendo que el núcleo del virus penetre al citosol. Para ciertas realizaciones, que utilizan partículas integrantes del vector lentivírico, después de la transcripción inversa y la migración del producto al núcleo, el genoma del virus se integra en el genoma de la célula diana, incorporando la(s) secuencia(s) de interés en el genoma de la célula diana. Para reducir la posibilidad de mutagénesis insercional y promover la expresión transitoria de uno o varios antígenos designados, sin embargo, otras realizaciones utilizan partículas de vectores lentivíricos deficientes en integración, que no se integran en el genoma de la célula diana, pero, en cambio, expresa la(s) secuencia(s) de interés de un episoma. De cualquier manera, la célula infectada luego expresa la(s) secuencia(s) de interés, por ejemplo, la IL-12 y opcionalmente un antígeno y/o una molécula estimuladora. Cuando se incluyen, el antígeno puede ser procesado por las células dendríticas y presentado a los linfocitos T y B, generando una respuesta inmune específica de antígeno. La vía específica descrita anteriormente no es necesaria siempre que la célula dendrítica sea capaz de estimular una respuesta inmune específica de antígeno.

Las partículas víricas pueden administrarse a un sujeto para proporcionar un efecto profiláctico o terapéutico. El producto de la secuencia de interés es normalmente IL-12 de cadena única (scIL-12) u otra forma de IL-12 y también puede incluir un antígeno de un agente causante de enfermedad o una célula enferma (por ejemplo, una célula tumoral), y o moléculas inmunomoduladoras adicionales, tales como citocinas. Tras la infección de las células dendríticas y la expresión del producto, la IL-12 se expresa y, en aquellas realizaciones donde el antígeno se expresa a partir del vector además de la IL-12, se genera una respuesta inmune al antígeno y es estimulada por el producto de IL-12 expresado. La respuesta inmune puede ser humoral o celular o ambas.

A. Envoltura del vector vírico

Los vectores víricos descritos en el presente documento generalmente están pseudotipados con una proteína de envoltura de un virus heterólogo. En determinadas realizaciones, los vectores víricos se pseudotipan con glicoproteína de la envoltura VSVg. En otras realizaciones, los vectores víricos se pueden pseudotipar con una glicoproteína de envoltura derivada de un VIH heterólogo (por ejemplo, VIH-2) u otro retrovirus heterólogo como el virus de inmunodeficiencia felina (FIV), el virus de la anemia infecciosa equina, el virus de inmunodeficiencia simia (SIV) o el virus maedi/visna.

En realizaciones particulares, los vectores víricos descritos en el presente documento se pseudotipan con una glicoproteína de la envoltura que proviene de un Arbovirus. Los virus transmitidos por artrópodos (Arbovirus) son virus que se transmiten a un hospedador, tal como seres humanos, caballos o pájaros por un vector artrópodo infectado como un mosquito. Los arbovirus se dividen en subfamilias de virus, incluidos alfavirus y flavivirus, que tienen un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva y una envoltura que contiene glicoproteína. Por ejemplo, el virus de la fiebre del dengue, el virus de la fiebre amarilla y el virus del Nilo Occidental pertenecen a la familia de los flavivirus, y el virus Sindbis, el virus del bosque Semliki y el virus de la encefalitis equina venezolana, son miembros de la familia de los alfavirus (Wang et al. *J. Virol.* 66, 4992 (1992)). La envoltura del virus Sindbis incluye dos glicoproteínas transmembrana (Mukhopadhyay et al. *Nature Rev. Microbio.* 3, 13 (2005)): se cree que E1 es responsable de la fusión, y se cree que E2 es responsable de la unión celular. Se sabe que las glicoproteínas de la envoltura del virus Sindbis son pseudotipo de otros retrovirus, incluyendo oncorretrovirus y lentivirus.

Tal como se ha tratado anteriormente, se puede usar una glicoproteína de la envoltura de arbovirus para pseudotipar un genoma de vector basado en lentivirus. Un lentivirus "pseudotipado" es una partícula lentivírica que tiene una o más glicoproteínas de la envoltura que están codificadas por un virus que es distinto del genoma lentivírico. La glicoproteína de la envoltura puede modificarse, mutarse o diseñarse tal como se describe en el presente documento.

La envoltura del virus Sindbis y otros alfavirus se incorpora a la bicapa lipídica de la membrana de partículas víricas, y normalmente incluye múltiples copias de dos glicoproteínas, E1 y E2. Cada glicoproteína tiene regiones transmembrana; E2 tiene un dominio citoplasmático de aproximadamente 33 restos, mientras que la cola citoplasmática de E1 es muy corta (aproximadamente 2 restos). Tanto E1 como E2 tienen ácidos palmíticos unidos en o cerca de las regiones transmembrana. E2 se sintetiza inicialmente como una proteína precursora que se escinde por furina u otra serina proteinasa dependiente de Ca²⁺ en E2 y una pequeña glicoproteína llamada E3. Ubicada entre las secuencias que codifican E2 y E1, se encuentra una secuencia que codifica una proteína llamada 6K. E3 y 6K son secuencias señal que sirven para translocar las glicoproteínas E2 y E1, respectivamente, en la membrana. En el genoma del virus Sindbis, la región codificante para las proteínas de la envoltura de Sindbis incluye la secuencia que codifica E3, E2, 6K y E1. Tal como se usa en el presente documento, la "envoltura" de un virus arbovirus incluye al menos E2, y también puede incluir E1, 6K y E3. Una secuencia a modo de ejemplo de

glicoproteínas de la envoltura del virus Sindbis, cepa HR, se presenta como la SEQ ID NO: 17 del documento WO 2011/011584. Se pueden encontrar secuencias de glicoproteínas de la envoltura para otros arbovirus en, por ejemplo, GenBank. Por ejemplo, la secuencia codificante de las glicoproteínas del virus del dengue se puede encontrar en el número de registro GQ252677 (entre otros en GenBank) y en la base de datos de variación del virus en el NCBI y la secuencia que codifica las glicoproteínas de la envoltura del virus de la encefalitis equina venezolana en el número de registro NP 040824.

Aunque los receptores celulares en las células dendríticas para los alfavirus, y el virus Sindbis en particular, no se han identificado definitivamente hasta la fecha, un receptor parece ser DC-SIGN (Klimstra et al., J Virol 77: 12022, 2003). El uso de los términos "anclaje", "unión", "direccionamiento" y similares se usan indistintamente y no pretenden indicar un mecanismo de interacción entre la glicoproteína de la envoltura del virus Sindbis y un componente celular. El DC-SIGN (molécula de adhesión intercelular 3 (ICAM-3) no asociada a integrina, específica de células dendríticas; también conocido como CD209) es un receptor de tipo lectina de tipo C capaz de la unión rápida y de endocitosis de materiales (Geijtenbeek, T. B., et al. Annu. Rev. Immunol. 22: 33-54, 2004). E2 parece dirigir el virus a las células dendríticas a través de DC-SIGN. Como se muestra en el presente documento, las células que expresan DC-SIGN son transducidas por partículas víricas pseudotipadas con la E2 del virus Sindbis mejor (al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, o al menos 10 veces mejor) que las células isogénicas que no expresan DC-SIGN. El mecanismo de cómo la glicoproteína E2 facilita la infección vírica parece implicar al DC-SIGN, posiblemente a través de la unión directa a DC-SIGN o causando un cambio en la conformación o algún otro mecanismo. Independientemente del mecanismo real, el direccionamiento por E2 es preferencial para las células que expresan DC-SIGN, a saber, células dendríticas.

El virus Sindbis también parece unirse a las células a través de heparán sulfato (Klimstra et al., J Virol 72: 7357, 1998; Burmes y Griffin, J Virol 72: 7349, 1998). Debido a que el heparán sulfato y otros glicosaminoglicanos de la superficie celular se encuentran en la superficie de la mayoría de los tipos celulares, es deseable reducir la interacción entre el heparán sulfato y las glicoproteínas de la envoltura de Sindbis. Esto se puede lograr disminuyendo la unión de la envoltura del virus Sindbis al heparán sulfato o aumentando la unión, por ejemplo, aumentando la avidéz, de la envoltura del virus Sindbis a las células dendríticas o ambas. Como resultado, la unión no específica a otras moléculas, que puede expresarse por otros tipos de células y que puede ocurrir incluso si la envoltura es específica para DC-SIGN, se reduce y la especificidad mejorada puede servir para evitar efectos secundarios no deseados, tales como los efectos secundarios que pueden reducir la respuesta inmune deseada, o los efectos secundarios asociados con la transducción fuera de la diana de otros tipos de células. Como alternativa, o además de las ventajas de la transducción relativamente específica de células que expresan DC-SIGN, las partículas víricas pseudotipificadas con la glicoproteína E2 de la envoltura del virus Sindbis pueden ofrecer otras ventajas sobre las partículas víricas pseudotipificadas con glicoproteínas como VSVG. Los ejemplos de tales ventajas incluyen la lisis mediada por el complemento reducida y/o el direccionamiento reducido de las células neuronales, se cree que ambas se asocian con la administración de partículas víricas pseudotipadas VSV-G.

En diversas ejemplificaciones, las partículas del vector lentivírico se unen específicamente a las células que expresan DC-SIGN y tienen una unión reducida o anulada al heparán sulfato. Es decir, una glicoproteína E2 de la envoltura del virus Sindbis puede modificarse para dirigir preferentemente el virus a las células dendríticas que expresan DC-SIGN en relación con otros tipos de células. Basándose en información obtenida de estudios estructurales y modelos moleculares entre otros estudios, las variantes de secuencias de proteínas de la envoltura, especialmente las glicoproteínas E2 y E1, están diseñadas y generadas de manera que las glicoproteínas mantengan sus funciones como proteínas de la envoltura, pero tienen la especificidad de unión, avidéz o nivel de unión deseados. Se pueden crear variantes de secuencias candidatas para cada glicoproteína y analizarlas usando los métodos descritos a continuación, u otros métodos conocidos en la técnica, para identificar glicoproteínas de envoltura con las características más deseables.

Ciertas variantes de secuencias de la E2 del Sindbis tienen al menos una alteración de aminoácidos en el resto 160 en comparación con la SEQ ID NO: 1. El resto 160 se deleta o cambia a un aminoácido distinto del ácido glutámico. Una alteración es más comúnmente una sustitución de al menos un aminoácido, pero, como alternativa, puede ser una adición o deleción de uno o más aminoácidos. Preferentemente, los aminoácidos adicionales son pocos y no comprenden un epítipo antigénico (por ejemplo, secuencia de marcaje de hemaglutinina), que puede comprometer la seguridad. Cuando existen dos o más alteraciones, ambas pueden ser del mismo tipo (por ejemplo, sustitución) o de diferentes tipos (por ejemplo, una sustitución y una deleción). Se pueden dispersar o localizar múltiples alteraciones contiguas en la secuencia de la proteína. Las variantes ilustrativas de las glicoproteínas E2 para su uso en la presente invención se describen en el documento WO2011011584 e incluyen cualquiera de las SEQ ID NO: 3-15 del listado de secuencias proporcionado en el presente documento y las variantes de las mismas descritas en el presente documento.

En primer lugar, las variantes de secuencias comprenden al menos una alteración de aminoácidos en la región de aproximadamente el resto 50 a aproximadamente el resto 180. Dentro de esta región hay aminoácidos que están implicados en la unión al heparán sulfato. Al reducir la carga positiva neta de E2, la interacción electrostática con heparán sulfato puede reducirse, dando como resultado una disminución de la unión al heparán sulfato. Los

aminoácidos candidatos con carga positiva en esta región incluyen lisinas en los restos 63, 70, 76, 84, 97, 104, 129, 131, 133, 139, 148, 149, 159 y arginina en los restos 65, 92, 128, 137, 157, 170, 172 (Bear et al., *Virology* 347: 183-190, 2006). Al menos varios de estos aminoácidos están directamente implicados en la unión de E2 al heparán sulfato. La carga positiva neta se puede reducir mediante la delección de lisina o arginina o la sustitución de lisina o arginina con un aminoácido neutro o con carga negativa. Por ejemplo, una o más de estas lisinas y argininas se pueden sustituir con ácido glutámico o aspártico. Ciertas realizaciones tienen al menos una sustitución de lisina 70, 76 o 159. En los casos en que E2 se expresa como una poliproteína con E3, la lisina ubicada adyacente al sitio natural de escisión E3/E2 se mantiene, es decir, la secuencia de reconocimiento y el sitio de escisión no se alteran. Como alternativa, la secuencia del sitio de escisión de endopeptidasa natural se sustituye con una secuencia de reconocimiento para una endopeptidasa diferente.

Ciertas variantes de E2 también se modifican de una manera que afecta positivamente a la unión a las células dendríticas. La alteración del ácido glutámico encontrada en el resto 160 en la secuencia de la HR de referencia puede mejorar la unión a las células dendríticas (véase Gardner et al., *J Virol* 74, 11849, 2000). Las alteraciones, tales como una delección del resto 160 o la sustitución del resto 160 se encuentran en ciertas variantes. En variantes particulares, se sustituye Glu por un aminoácido no cargado, en otras variantes, se sustituye Glu por un aminoácido no ácido. Normalmente, Glu160 se sustituye con uno de los aminoácidos pequeños o alifáticos, incluyendo glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina.

Otras variantes comprenden dos o más alteraciones de aminoácidos. Normalmente, en estas variantes, una de las alteraciones es Glu160 y las alteraciones restantes son cambios de una o más de las lisinas y argininas en la región que abarca el de aproximadamente el resto 50 a aproximadamente el 180. Algunas de las variantes comprenden una alteración de Glu160 a un resto o delección no ácido y una o más alteraciones de lisina 70, lisina 76 o lisina 159 con un aminoácido no básico. Algunas variantes específicas comprenden un Glu160 a Gly, Lys 70 a Glu y Lys 159 a Glu; un Glu 160 a Gly, Lys 70, 76 y 159 a Glu; una delección de Glu 160 y Lys 70 y 159 a Glu; y una delección de Glu 160 y Lys 70, 76 y 159 a Glu.

En determinados casos, La proteína E2 se expresa primero como una poliproteína en fusión con al menos E3 o en fusión con una secuencia líder. Independientemente de si la secuencia líder es E3 u otra secuencia, E2 en la envoltura vírica debe estar libre de E3 u otra secuencia líder. En otras palabras, E2 preferentemente no es una proteína de fusión E3/E2 (por ejemplo, la proteína de fusión E3/E2 llamada SVGmu). En determinadas realizaciones, E2 se expresa como parte de la poliproteína E3-E2-6K-E1. El virus Sindbis expresa de manera natural E2 como parte de una poliproteína y las regiones de unión para E3/E2, E2/6K y 6K/E1 tienen secuencias reconocidas y escindidas por endopeptidasas. Normalmente, la unión E3/E2 se escinde mediante furina o una serina endopeptidasa similar a furina entre los restos 65 y 66. La furina tiene especificidad por los restos de arginina emparejados que están separados por dos aminoácidos. Para mantener la escisión E3/E2 por furina, los restos 62-66 (RSKRS; SEQ ID NO: 26) deben mantener los dos restos de arginina con separación de dos aminoácidos y el resto de serina. Como alternativa, se puede usar una secuencia de escisión diferente en lugar de la secuencia de escisión de furina E3/E2 o cualquiera de las otras secuencias de escisión. Se pueden incorporar sitios de reconocimiento y escisión para endopeptidasas, incluyendo, sin limitación, endopeptidasas aspárticas (por ejemplo, catepsina D, quimosina, proteasa del VIH), cisteína endopeptidasas (bromelinas, papaína, calpaína), metaloendopeptidasas, (por ejemplo, collagenasa, termolisina), serina endopeptidasas (por ejemplo, quimiotripsina, factor IXa, factor X, trombina, tripsina), estreptocinasas. Las secuencias del sitio de reconocimiento y escisión para estas enzimas son bien conocidas.

Los aminoácidos en E2, aparte de los ya mencionados, también se pueden alterar. De manera general, una variante de secuencia E2 tendrá al menos un 80 % de identidad de aminoácidos de secuencia con la secuencia E2 de referencia, o puede tener al menos un 82 %, al menos un 85 %, al menos un 87 %, al menos un 90 %, al menos un 92 %, al menos un 95 % o al menos un 98 % de identidad de secuencia. La variante de glicoproteína debe presentar función biológica, tal como la capacidad de facilitar la infección de células dendríticas por una partícula vírica que tiene una envoltura que comprende E2. Los experimentos han identificado regiones de glicoproteínas de la envoltura que parecen tener un papel importante en varios aspectos del ensamblaje vírico, fijación a la superficie celular e infección. Al hacer variantes, se puede usar la siguiente información como directrices. La cola citoplasmática de E2 - aproximadamente los restos 408 a 415 - es importante para el ensamblaje del virus (West et al. *J Virol* 80: 4458-4468, 2006; 8). Otras regiones están implicadas en la formación de la estructura secundaria (aproximadamente los restos 33-53); e implicadas en el transporte y la estabilidad de la proteína (aproximadamente los restos 86-119) (Navaratmarajah et al., *J Virol* 363: 124-147, 2007;). La variante puede conservar el carácter hidrófobo de una región que se extiende por la membrana, de aproximadamente los restos 370-380. La variante puede conservar uno o ambos restos de sitios de glucosilación N-ligados (restos 196-198) y NFT (restos 318-320) y puede conservar uno o más de los sitios que están palmitoilados (C-396, C416 y C417) (Strauss y Strauss *Microbiol Rev* 58, 491-562, 1994; págs. 499-509). Por otra parte, se pueden alterar muchas regiones de E2 sin eventos nocivos. Por ejemplo, las inserciones de transposones en muchos lugares diferentes en E2 todavía dieron como resultado un virus viable (Navaratmarajah, *ibid*).

En determinadas realizaciones, se puede incorporar un péptido marcador en las proteínas E3, 6K o E1. Para algunos fines, se puede incorporar un marcador en E2, pero no es deseable usar un marcador en un producto para

administrar a pacientes humanos. Un péptido marcador, que es una secuencia corta (por ejemplo, de 5-30 aminoácidos), se puede usar para facilitar la detección de la expresión de la envoltura y su presencia en partículas víricas. Para fines de detección, una secuencia de marcador normalmente será detectable por anticuerpos o productos químicos. Otro uso para un marcador es facilitar la purificación de partículas víricas. Se puede usar un sustrato que contiene un miembro de unión para absorber el virus. La elución del virus se puede lograr mediante el tratamiento con un resto que desplaza el marcador del miembro de unión o cuando la secuencia del marcador está unida a una secuencia escindible, el tratamiento con la endopeptidasa apropiada permitirá convenientemente la liberación del virus. (Véase, por ejemplo, el catálogo de Qiagen, Sistema de proteasa Factor Xa). La eliminación del péptido marcador es generalmente deseable por razones de seguridad del uso de partículas víricas en sujetos animales. Si no se elimina el marcador, se puede producir una respuesta inmune al marcador.

Los marcadores adecuados incluyen, sin limitación, FLAG (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 28) (Patente de EE.UU. N.º 4.703.004.), para los cuales los anticuerpos están disponibles comercialmente, proteína de unión a quitina, proteína de unión a maltosa, glutatión-S-transferasa, poli(His) (Patente de EE.UU. N.º 4.569.794.), tiorredoxina, marcador de HA (hemaglutinina), entre otras. La poli(His) se puede adsorber en medios de afinidad que contienen iones metálicos unidos, por ejemplo, níquel o cobalto, y se eluyó con un medio de pH bajo.

Las partículas víricas se pueden evaluar para determinar la especificidad de la glicoproteína de la envoltura incorporada en el virus que se dirige a las células dendríticas. Por ejemplo, se puede obtener una población mixta de células de la médula ósea de un sujeto y cultivarla *in vitro*. Como alternativa, se pueden obtener y usar líneas de células isogénicas que expresan o no expresan DC-SIGN. El virus recombinante puede administrarse a la población mixta de células de la médula ósea o a líneas celulares isogénicas, y la expresión de un gen reportero incorporado en el virus puede analizarse en las células cultivadas. Ciertas realizaciones pueden emplear un análisis de dilución limitante, en el que la población mixta de células se divide en partes separadas, que luego se incuban por separado con cantidades decrecientes de virus (por ejemplo, 2 veces, 5 veces, 10 veces menos virus en cada parte). En algunas realizaciones, al menos aproximadamente un 50 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 %, aún más preferiblemente, al menos aproximadamente un 95 % de las células infectadas en la población de células mixtas son células dendríticas que expresan DC-SIGN. En determinadas realizaciones, la proporción de células dendríticas infectadas frente a células no dendríticas infectadas (o células que no expresan DC-SIGN) es al menos aproximadamente 2:1, al menos aproximadamente 3:1, al menos aproximadamente 4:1, al menos aproximadamente 5:1, al menos aproximadamente 6:1, al menos aproximadamente 7:1, al menos aproximadamente 8:1, al menos aproximadamente 9:1, al menos aproximadamente 10:1, al menos aproximadamente 20:1, al menos aproximadamente 30:1, al menos aproximadamente 40:1, al menos aproximadamente 50:1, al menos aproximadamente 100:1, al menos aproximadamente 200:1, al menos aproximadamente 500:1, al menos aproximadamente 1000:1, al menos aproximadamente 5000:1, al menos aproximadamente 10.000:1 o más. Para limitar la dilución, normalmente se observa una mayor selectividad a diluciones mayores (es decir, cantidades menores) de virus de entrada.

La actividad de las partículas víricas pseudotipadas puede determinar mediante cualquiera de varias técnicas. Por ejemplo, un método preferido para medir la eficacia de la infectividad (UI, unidades infecciosas) es administrar partículas víricas a las células y medir la expresión de un producto codificado en el genoma del vector. Se puede usar cualquier producto que se pueda analizar. Un tipo conveniente de producto es una proteína fluorescente, tal como la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés). La GFP y el ensayo se ejemplifican en los Ejemplos. Otros productos que se pueden usar incluyen proteínas expresadas en una superficie celular (por ejemplo, detección por unión de anticuerpos), enzimas y similares. Para la detección de IL-12, pueden usarse ensayos de detección de IL-12 (por ejemplo, ELISA) o ensayos de función biológica (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1). Cuando el producto incluye un antígeno y las células son células dendríticas, la infectividad/actividad puede evaluarse determinando una respuesta inmune específica de antígeno. Además, es posible determinar los efectos secundarios en un mamífero. La capacidad de apuntar específicamente a las células dendríticas también se puede probar directamente, por ejemplo, en cultivo celular, tal como se describe a continuación.

Las partículas víricas también se pueden preparar y probar su selectividad y/o su capacidad para facilitar la penetración en la membrana de la célula diana. Las partículas víricas que tienen una envoltura con glicoproteínas no modificadas se pueden usar como controles para la comparación. Brevemente, las células que expresan un receptor para una glicoproteína de la envoltura se infectan por el virus usando un ensayo de infección convencional. Después de un tiempo especificado, por ejemplo 48 horas después de la infección, las células se pueden recolectar y el porcentaje de células infectadas por el virus se puede determinar mediante citometría de flujo, por ejemplo. La selectividad se puede puntuar calculando el porcentaje de células infectadas por el virus. De manera similar, el efecto de una variante de glicoproteína de la envoltura sobre el título vírico se puede cuantificar dividiendo el porcentaje de células infectadas por el virus que comprende una variante de la envoltura variante entre el porcentaje de células infectadas por virus que comprende la correspondiente glicoproteína de envoltura de tipo silvestre (sin modificar). Una variante particularmente adecuada tendrá la mejor combinación de selectividad y título infeccioso. Una vez que se selecciona una variante, se pueden realizar ensayos de concentración vírica para confirmar que estos virus se pueden concentrar sin comprometer la actividad. Los sobrenadantes víricos se recogen y concentran por ultracentrifugación. Los títulos de los virus se pueden determinar mediante la dilución limitada de la solución madre vírica y la infección de las células que expresan el receptor de la glicoproteína de la envoltura, midiendo la

expresión de un producto expresado por los virus tal como se describió anteriormente.

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

Para investigar si la penetración depende de un pH bajo e identificar las glicoproteínas de la envoltura con la dependencia del pH deseada, se puede añadir NH₄Cl u otro compuesto que altera el pH en la etapa de infección (el NH₄Cl neutralizará los compartimentos ácidos de los endosomas). En el caso del NH₄Cl, la desaparición de las células azules indicará que la penetración de los virus depende del pH bajo. Además, para confirmar que la actividad depende del pH, se pueden añadir al tampón de incubación agentes lisosomotrópicos, tales como el cloruro de amonio, cloroquina, concanamicina, bafilomicina A1, monensina nigericina, etc. Estos agentes aumentan el pH dentro de los compartimentos endosómicos (por ejemplo, Droese y Altendorf, *J. Exp. Biol.* 200, 1-8, 1997). El efecto inhibitorio de estos agentes revelará el papel del pH para la fusión y entrada del virus. Se pueden comparar las diferentes cinéticas de entrada entre virus que muestran diferentes moléculas fusogénicas y seleccionar la más adecuada para una aplicación particular.

Los ensayos de entrada basados en PCR se pueden utilizar para controlar la transcripción inversa y medir la cinética de la síntesis de ADN vírico como una indicación de la cinética de la entrada del virus. Por ejemplo, las partículas víricas que comprenden una particular molécula de proteína de la envoltura se incuban con células diana, tales como las células 293T, CD, o cualquier otra célula que haya sido diseñada para expresar, o que exprese naturalmente, el miembro de unión apropiado (receptor) para la molécula de proteína de la envoltura. Ya sea inmediatamente o después de un aumento del tiempo (para permitir que ocurra una infección), los virus no unidos se eliminan y se analizan las alícuotas de las células para detectar ácidos nucleicos víricos. El ADN se extrae de estas alícuotas y se somete a un análisis de amplificación, generalmente en un ensayo semicuantitativo, cebado con cebadores específicos de LTR. La aparición de productos de ADN específicos de LTR indica el éxito de la entrada del virus.

B. Genoma del vector lentivírico

La partícula vírica del vector comprende un genoma, que comprende la secuencia que codifica la IL-12, tal como scIL-12, y opcionalmente una o más secuencias adicionales de interés. Se pueden incluir otras secuencias, tales como secuencias que permiten que el genoma se empaquete en la partícula vírica y secuencias que promuevan la expresión de las secuencias de interés después de la transducción de la célula diana. El genoma puede provenir de cualquiera de una gran cantidad de vectores basados en el genoma lentivírico adecuados y disponibles, incluidos los identificados para aplicaciones de terapia génica humana, tales como los descritos por Pfeifer y Verma (*Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:177-211, 2001;). En beneficio de la simplicidad, el genoma también se conoce como "genoma vírico del vector" o "genoma del vector".

50 1. Estructura principal

Los genomas de vectores lentivíricos adecuados incluyen aquellos basados en el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1), HIV-2, el virus de inmunodeficiencia felina (FIV), el virus de la anemia infecciosa equina, el virus de inmunodeficiencia simia (SIV) y el virus maedi/visna. Una característica deseable de los lentivirus es que pueden infectar tanto las células en división como las que no se dividen, no es necesario que las células diana se dividan (o estimulen a las células diana para que se dividan). De manera general, el genoma y las glicoproteínas de la envoltura se basarán en diferentes virus, de tal manera que la partícula del vector vírico resultante se pseudotipa. Las características de seguridad del genoma del vector se incorporan deseablemente. Las características de seguridad incluyen LTR auto inactivable y un genoma/partícula deficiente en la integración. Los vectores a modo de ejemplo se describen en el documento WO 2011/011584 y dichos vectores se pueden usar en realizaciones de la invención para la expresión de secuencias de interés, incluyendo IL-12, otras moléculas inmunoestimuladoras, citocinas y antígenos de interés.

En algunas realizaciones a modo de ejemplo, el genoma vírico del vector comprende secuencias de un genoma lentivírico, tales como el genoma del VIH-1 o el genoma del SIV. La construcción del genoma vírico puede comprender secuencias de las LTR 5' y 3' de un lentivirus, y en particular puede comprender las secuencias R y U5

de 5' LTR de un lentivirus y una 3' LTR inactivada o autoinactivada de un lentivirus. Las secuencias LTR pueden ser secuencias LTR de cualquier lentivirus de cualquier especie. Por ejemplo, pueden ser secuencias LTR del VIH, SIV, FIV o BIV. Normalmente, las secuencias LTR son secuencias LTR del VIH.

- 5 El genoma del vector puede comprender una 3' LTR inactivada o autoactivada (Zufferey et al. J Virol 72: 9873, 1998; Miyoshi et al., J Virol 72:8150, 1998;). Un vector autoinactivador generalmente tiene una delección de las secuencias potenciadoras y promotoras de la repetición terminal larga (LTR, por sus siglas en inglés) de 3', que se copia en la 5' LTR durante la integración de vectores. En un caso, el elemento U3 de la 3' LTR contiene una delección de su secuencia potenciadora, los sitios de TATA box, Sp1 y NF-kappa B. Como resultado de la autoinactivación de la 3' LTR, el provirus que se genera después de la entrada y la transcripción inversa comprenderá una 5' LTR inactivada. Lo lógico es mejorar la seguridad al reducir el riesgo de movilización del genoma del vector y la influencia de la LTR en los promotores celulares cercanos. La 3' LTR autoinactivadora se puede construir por cualquier método conocido en la técnica.
- 10
- 15 Opcionalmente, la secuencia U3 de la 5'LTR lentivírica se puede reemplazar con una secuencia promotora en la construcción vírica, tal como una secuencia promotora heteróloga. Esto puede aumentar el título de virus recuperado de la línea celular de empaquetamiento. También se puede incluir una secuencia potenciadora. Se puede usar cualquier combinación de potenciador/promotor que aumente la expresión del genoma de ARN vírico en la línea celular de empaquetamiento. En un ejemplo, se usa la secuencia de potenciador/promotor del CMV (documentos US 5385839 y US 5168062,).
- 20

En determinadas realizaciones, el riesgo de mutagénesis por inserción se minimiza mediante la construcción del genoma del vector lentivírico para que sea defectuoso en la integración. Se puede seguir varios enfoques para producir un genoma del vector no integrante/deficiente en integración. Estos enfoques implican diseñar una(s) mutación(es) en el componente de enzima integrasa del gen *pol*, de tal manera que codifica una proteína con una integrasa inactiva. El genoma del vector en sí puede modificarse para evitar la integración, por ejemplo, mutando o delecionando uno o ambos sitios de unión, o haciendo que la 3' LTR-tracto de polipurina proximal (PPT) no sea funcional mediante delección o modificación. Además, los enfoques no genéticos están disponibles; éstos incluyen agentes farmacológicos que inhiben una o más funciones de la integrasa. Los enfoques no son mutuamente excluyentes, es decir, se puede usar más de uno a la vez. Por ejemplo, tanto la integrasa como los sitios de unión pueden no ser funcionales, o la integrasa y el sitio PPT pueden no ser funcionales, o los sitios de unión y el sitio de PPT pueden no ser funcionales, o todos ellos pueden no ser funcionales.

25

30

Como se ha indicado anteriormente, un enfoque es crear y utilizar una integrasa no funcional. La integrasa está implicada en la escisión del ADN vírico bicatenario de extremos romos y une los extremos a los 5'-fosfatos en las dos hebras de un sitio cromosómico diana. La integrasa tiene tres dominios funcionales: dominio N-terminal, que contiene un motivo de unión de zinc (HHCC), el núcleo del dominio central, que contiene el núcleo catalítico y un motivo DD35E conservado (D64, D116, E152 en VIH-1), y un dominio C-terminal, que tiene propiedades de unión al ADN. Las mutaciones puntuales introducidas en la integrasa son suficientes para alterar la función normal. Se han construido y caracterizado muchas mutaciones de integrasa (véase, Philpott y Thrasher, Human Gene Therapy 18:483, 2007; Apolonia, Tesis presentada al University College London, abril de 2009, págs. 82-97; Engelman et al. J Virol 69:2729, 1995; Nightingale et al. Mol Therapy, 13: 1121, 2006;). La secuencia que codifica la proteína integrasa se puede delecionar o mutar para hacer que la proteína esté inactiva, preferentemente sin afectar significativamente a la actividad de la transcriptasa inversa o al direccionamiento nuclear, evitando así la integración del provirus en el genoma de la célula diana. Las mutaciones aceptables pueden reducir la catálisis de integrasa, la transferencia de filamentos, la unión a sitios *att*, la unión al ADN cromosómico del hospedador y otras funciones. Por ejemplo, una sola sustitución de ácido aspártico a asparagina en el resto 35 de la integrasa del VIH o SIV elimina por completo la integración del ADN vírico. Las delecciones de integrasa generalmente se limitarán al dominio C-terminal. La delección de la secuencia codificante para los restos 235-288 da como resultado una integrasa no funcional útil (Engelman et al. J Virol 69:2729, 1995). Como ejemplos adicionales, se pueden generar mutaciones, por ejemplo, Asp64 (se dan números de restos para VIH-1, los números de los restos correspondientes para la integrasa de otros lentivirus o retrovirus se pueden determinar fácilmente por un experto en la materia (por ejemplo, D64E, D64V), Asp116 (por ejemplo, D116N), Asn120 (por ejemplo, N120K), Glu152, Gln148 (por ejemplo, Q148A), Lys156, Lys159, Trp235 (por ejemplo, W235E), Lys264 (por ejemplo, K264R), Lys266 (por ejemplo, K266R), Lys273 (por ejemplo, K273R). Se pueden construir y probar otras mutaciones para la integración, la expresión transgénica y cualquier otro parámetro deseable. Los ensayos para estas funciones son bien conocidos. Las mutaciones pueden generarse por cualquiera de varias técnicas, incluyendo mutagénesis de sitio dirigido y síntesis química de la secuencia de ácido nucleico. Se puede hacer una mutación o más de una de estas mutaciones puede estar presente en la integrasa. Por ejemplo, una integrasa puede tener mutaciones en dos aminoácidos, tres aminoácidos, cuatro aminoácidos, y así sucesivamente.

35

40

45

50

55

60

Como alternativa o en combinación con el uso de mutantes de integrasa, los sitios de unión (*att*) en U3 y U5 también se pueden mutar. La integrasa se une a estos sitios y el dinucleótido 3'-terminal se escinde en ambos extremos del genoma del vector. Un dinucleótido CA se encuentra en el extremo 3' rebajado; el CA es necesario para el procesamiento, la mutación de los nucleótidos bloquea la integración en el cromosoma del hospedador. La A del dinucleótido CA es el nucleótido más crítico para la integración, y las mutaciones en ambos extremos del genoma

65

darán los mejores resultados (Brown et al J Virol 73:9011 (1999). En un ejemplo, el CA en cada extremo se cambia a TG. En otros ejemplos, el CA en cada extremo se cambia a TG en un extremo y GT en el otro extremo. En otros ejemplos, se deleciona el CA en cada extremo; en otros ejemplos, la A del CA se deleciona en cada extremo.

5 La integración también puede inhibirse por mutación o delección del tracto de polipurina (PPT) (documento WO 2009/076524;), ubicado proximalmente a la 3' LTR. El PPT es una secuencia de polipurina de aproximadamente 15 nucleótidos que puede servir como un sitio de unión de cebador para la síntesis de ADN de cadena positiva. En este caso, las mutaciones o delecciones del PPT se dirigen al proceso de transcripción inversa. Sin desear estar sujeto a un mecanismo, mutando o eliminando el PPT, la producción de ADN lineal se reduce radicalmente y esencialmente solo se producen círculos de ADN 1-LTR. La integración requiere un genoma de vector de ADN lineal bicatenario, y la integración se elimina esencialmente sin él. Como se ha indicado anteriormente, un PPT puede hacerse no funcional por mutación o por delección. Normalmente, se delecionan todos los aproximadamente 15 nt del PPT, aunque en algunas realizaciones, se pueden hacer delecciones más cortas de 14 nt, 13 nt, 12 nt, 11 nt, 10 nt, 9 nt, 8 nt, 7 nt, 6 nt, 5 nt, 4 nt, 3 nt y 2 nt. Cuando se hacen mutaciones, normalmente se hacen múltiples mutaciones, especialmente en la mitad 5' del PPT (McWilliams et al., J Virol 77:11150, 2003), aunque las mutaciones simples y dobles en las primeras cuatro bases aún reducen la transcripción. Las mutaciones hechas en el extremo 3' del PPT generalmente tienen un efecto más dramático (Powell y Levin J Virol 70:5288, 1996).

20 Estos diferentes enfoques para hacer que un genoma del vector no se integre se pueden usar individualmente o en combinación. Se puede usar más de un enfoque para construir un vector a prueba de fallos a través de mecanismos redundantes. Por lo tanto, las mutaciones o delecciones del PPT se pueden combinar con las mutaciones o delecciones de sitio *att* o con mutaciones de integrasa o mutaciones o delecciones del PPT se pueden combinar con ambas mutaciones o delecciones del sitio *att* y mutaciones de integrasa. De manera similar, las mutaciones o delecciones del sitio *att* y las mutaciones de integrasa pueden combinarse entre sí o con mutaciones o delecciones del PPT.

2. Elementos reguladores

30 Tal como se trata en el presente documento, el genoma del vector vírico comprende una secuencia que codifica la IL-12 y opcionalmente uno o más de otros ácidos nucleicos de interés que es deseable expresar en células diana. Por simplicidad, el término "secuencia de interés" (SDI) se usa para referirse a la IL-12 y, en determinadas realizaciones, una o más secuencias de interés (tal como una o más moléculas inmunoestimuladoras, citocinas o uno o más antígenos). Normalmente, las secuencias de interés se encuentran entre las secuencias 5' LTR y 3' LTR. Además, la secuencia que codifica la IL-12 y cualquier otra secuencia de interés está preferentemente en una relación funcional con otros elementos genéticos, por ejemplo secuencias reguladoras de la transcripción que incluyen promotores o potenciadores, para regular la expresión de la secuencia de interés de una manera particular. En determinados casos, las secuencias reguladoras transcripcionales útiles son aquellas que están altamente reguladas con respecto a la actividad, tanto temporal como espacialmente. Los elementos de control de la expresión que pueden usarse para regular la expresión de los componentes se conocen en la materia e incluyen, pero sin limitación, promotores inducibles, promotores constitutivos, señales de secreción, potenciadores y otros elementos reguladores.

45 La secuencia de interés y cualquier otra secuencia expresable están normalmente en una relación funcional con secuencias reguladoras internas de promotor/potenciador. Un promotor/potenciador "interno" es uno que está ubicado entre las secuencias 5' LTR y 3' LTR en la construcción del vector vírico y está operativamente unida a la secuencia de interés. El promotor/potenciador interno puede ser cualquier promotor, potenciador o combinación de promotor/potenciador conocido por aumentar la expresión de un gen con el que está en una relación funcional. Una "relación funcional" y "operablemente vinculados" significan, sin limitación, que la secuencia está en la ubicación y orientación correcta con respecto al promotor y/o potenciador, que la secuencia de interés se expresará cuando el promotor y/o el potenciador se pongan en contacto con las moléculas apropiadas.

55 La elección de un promotor/potenciador interno se basa en el patrón de expresión deseado de la secuencia de interés y las propiedades específicas de los promotores/potenciadores conocidos. Por lo tanto, el promotor interno puede ser constitutivamente activo. Los ejemplos no limitantes de promotores constitutivos que pueden usarse incluyen el promotor para ubiquitina (documentos US 5510474; WO 98/32869;), CMV (Thomsen et al., PNAS 81:659, 1984; documento US 5168062;), beta-actina (Gunning et al. 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 84:4831-4835;) y pgk (véase, por ejemplo, Adra et al. 1987 Gene 60:65-74; Singer-Sam et al. 1984 Gene 32:409-417; y Dobson et al. 1982 Nucleic Acids Res. 10:2635-2637;).

60 Como alternativa, el promotor puede ser un promotor específico de tejido. En algunas realizaciones preferentes, el promotor es un promotor específico de célula diana. Por ejemplo, el promotor puede ser de cualquier producto expresado por células dendríticas, incluyendo CD11c, CD103, TLR, DC-SIGN, BDCA-3, DEC-205, DCIR2, receptor de manosa, dectina-1, Clec9A, MHC de clase II. Además, los promotores pueden seleccionarse para permitir la expresión inducible de la secuencia de interés. En la técnica se conocen varios sistemas para la expresión inducible, incluyendo el sistema sensible a la tetraciclina, el sistema operador-represor lac, así como promotores que responden a varios cambios ambientales o fisiológicos, incluyendo choque térmico, iones de metal, tales como el

promotor de metalotioneína, interferones, hipoxia, esteroides, tales como la progesterona o el promotor del receptor de glucocorticoides, radiación, tal como el promotor VEGF. También se puede usar una combinación de promotores para obtener la expresión deseada del gen de interés. El experto en la materia podrá seleccionar un promotor basado en el patrón de expresión deseado del gen en el organismo o la célula diana de interés.

5 El genoma vírico puede comprender al menos un promotor sensible a la ARN polimerasa II o III. Este promotor puede estar operativamente unido a la secuencia de interés y también puede estar unido a una secuencia de terminación. Además, se pueden incorporar más de un promotor de ARN polimerasa II o III. Los promotores de ARN polimerasa II y III son bien conocidos por un experto en la materia. Se puede encontrar un intervalo adecuado de promotores de ARN polimerasa III, por ejemplo, en Paule y White, *Nucleic Acids Research*, Vol. 28, págs. 1283-1298 (2000). Los promotores de ARN polimerasa II o III también incluyen cualquier fragmento de ADN sintético o modificado que pueda dirigir la ARN polimerasa II o III para transcribir secuencias de codificación de ARN aguas abajo. Además, el promotor o promotores de ARN polimerasa II o III (Pol II o III) utilizados como parte del genoma vírico del vector puede ser inducible. Se puede usar cualquier promotor inducible adecuado de Pol II o III con los métodos de la invención. Los promotores Pol II o III particularmente adecuados incluyen los promotores sensibles a la tetraciclina proporcionados en Ohkawa y Taira, *Human Gene Therapy*, Vol. 11, págs. 577-585 (2000) y en Meissner et al. *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, págs. 1672-1682 (2001).

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

25 Un genoma vírico del vector generalmente contendrá un promotor que es reconocido por la célula diana y que está operativamente vinculado a la secuencia de interés, a los componentes víricos y a otras secuencias tratadas en el presente documento. Un promotor es un elemento de control de la expresión formado por una secuencia de ácido nucleico que permite que se produzca la unión de la ARN polimerasa y la transcripción. Los promotores pueden ser inducibles, constitutivos, temporalmente activos o específicos del tejido. La actividad de los promotores inducibles se induce por la presencia o ausencia de factores bióticos o abióticos. Los promotores inducibles pueden ser una herramienta útil en la ingeniería genética porque la expresión de genes a los que están vinculados operativamente se puede activar o desactivar en ciertas etapas del desarrollo de un organismo, su fabricación, o en un tejido particular. Los promotores inducibles pueden agruparse como promotores regulados químicamente y promotores regulados físicamente. Los promotores típicos regulados químicamente incluyen, sin limitación, promotores regulados por alcohol (por ejemplo, el promotor del gen de la alcohol deshidrogenasa I (alcA)), promotores regulados por tetraciclina (por ejemplo, el promotor sensible a la tetraciclina), promotor regulado por esteroides (por ejemplo, el promotor basado en el receptor de glucocorticoides de rata (GR), promotor basado en el receptor de estrógeno humano (ER), promotor basado en el receptor de ecodisona de la polilla y los promotores basados en la superfamilia de receptores de esteroides/retinoides/tiroides), promotores regulados por metales (por ejemplo, promotores basados en genes de metalotioneína) y promotores relacionados con la patogénesis (por ejemplo, *Arabidopsis* y promotores basados en proteínas relacionadas con patógenos de maíz (PR)). Los promotores típicos regulados físicamente incluyen, pero sin limitación, promotores regulados por temperatura (por ejemplo, promotores de choque térmico) y promotores regulados por luz (por ejemplo, promotor SSU de soja). Otros promotores a modo de ejemplo se describen en otra parte, por ejemplo, en "Promotores utilizados para regular la expresión génica" en el sitio web de Patent Lens, consultado el 18 de mayo de 2009.

50 Un experto en la materia podrá seleccionar un promotor apropiado en función de las circunstancias específicas. Muchos promotores diferentes son bien conocidos en la técnica, al igual que los métodos para unir operativamente el promotor al gen que se va a expresar. Se pueden usar tanto secuencias promotoras naturales como muchos promotores heterólogos para dirigir la expresión en la célula de empaquetamiento y la célula diana. Se prefieren promotores heterólogos, sin embargo, ya que generalmente permiten una mayor transcripción y mayores rendimientos de la proteína deseada en comparación con el promotor natural.

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

65 La transcripción puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el (los) vector(es). Los potenciadores son normalmente elementos de ADN que actúan en cis, generalmente de 10 a 300 pb de longitud, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, alfafetoproteína e insulina) y de virus de células eucariotas. Los ejemplos

incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. El potenciador puede sufrir corte y empalme en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia de polinucleótido específica de antígeno, pero preferentemente se localiza en un sitio 5' del promotor.

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

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

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

30 Los plásmidos que contienen uno o más de los componentes descritos en el presente documento se construyen fácilmente usando técnicas estándar bien conocidas en la materia. Para el análisis para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos construidos, el plásmido puede replicarse en *E. coli*, purificarse y analizarse por digestión con endonucleasa de restricción o su secuencia de ADN se puede determinar por métodos convencionales.

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

45 Usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, un experto en la materia reconocerá que la eficacia de un sistema de expresión particular puede probarse transfectando células de empaquetamiento con un vector que comprende un gen que codifica una proteína reportera y midiendo la expresión usando una técnica adecuada, por ejemplo, midiendo la fluorescencia de un conjugado de proteína fluorescente verde. Los genes reporteros adecuados son bien conocidos en la técnica.

50 3. Tipos de secuencias de interés

Los vectores retrovíricos descritos en el presente documento codifican la IL-12 y opcionalmente, otras secuencias de interés que incluyen, pero sin limitación, moléculas inmunoestimuladoras, citocinas, quimiocinas, antígenos de interés, inhibidores del punto de control, etc.

55 Las secuencias de polinucleótidos que codifican la IL-12 son conocidas en la técnica y están disponibles en bases de datos públicas. Como entendería fácilmente el experto en la materia, la IL-12 es una citocina heterodimérica con múltiples efectos biológicos sobre el sistema inmunitario. Se compone de dos subunidades, p35 y p40, ambos necesarios para la secreción de la forma activa de IL-12, p70. En una realización, la secuencia de IL-12 (casete de expresión) comprende un polinucleótido que dirige la expresión del polipéptido de IL-12. Se puede usar cualquier polipéptido de IL-12, incluidas las variantes y derivados de moléculas conocidas de IL-12, en donde las variantes y derivados conservan la actividad de la IL-12. La actividad de la IL-12 se puede medir usando ensayos conocidos en la técnica (por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 1). En una realización, la IL-12 es la IL-12 humana. En otra realización, la IL-12 es la IL-12 de murino. En una realización, el polinucleótido comprende la secuencia de ambas subunidades de IL-12, p35 y p40, separadas por una secuencia IRES que permite la expresión de múltiples transgenes a partir de una única transcripción. En realizaciones particulares, los vectores descritos en el presente

documento codifican una cadena única IL-12 (scIL-12). En este sentido, la proteína de fusión de cadena única puede codificar subunidades de IL-12 en cualquier orientación, y en ciertas realizaciones puede incluir un enlazador entre las 2 subunidades, tales como p35-L-p40 o p40-L-p35. Un "enlazador" es un péptido que une o enlaza otros péptidos o polipéptidos, tal como un enlazador de aproximadamente 2 a aproximadamente 150 aminoácidos. Cualquiera de
 5 varios enlazadores son conocidos en la técnica y pueden usarse en el presente documento (véase, por ejemplo, Adv Drug Deliv Rev. 2013 Oct; 65 (10): 1357-69). En determinadas realizaciones, el enlazador es un enlazador de elastina.

También se pueden incluir otras secuencias de interés en los vectores víricos descritos en el presente documento. Por lo tanto, en este sentido, la secuencia de interés no está limitada de ninguna manera e incluye cualquier ácido nucleico que un experto en la materia desee haber transcrito y expresado en la célula diana. El producto puede ser una proteína o un ácido nucleico. La secuencia de interés puede codificar una proteína o una molécula de ácido nucleico, incluyendo ARNip, microARN, un ARN bicatenario autocomplementario en el que la región complementaria es mayor de aproximadamente 20 ribonucleótidos de longitud, o un ARN que es complementario a un ARN de mensaje, donde la unión de dicho ARN complementario (antisentido) al ARN del mensaje bloquea su capacidad de traducirse en proteína. En algunos casos, la secuencia de interés puede codificar un antígeno contra el cual se desea una respuesta inmunitaria. En particular, los antígenos tumorales y antígenos de enfermedades infecciosas de agentes tales como el VIH, HSV, VHC, VPH, malaria o tuberculosis son deseables.

En determinados casos, la secuencia de interés puede ser un gen que codifica un ARN inhibidor pequeño (ARNip) o un microARN (miARN) de interés que regula negativamente la expresión de una molécula. Por ejemplo, el gen que codifica un ARNip o un microARN puede usarse para regular negativamente la expresión de reguladores negativos en una célula, incluidos aquellos que inhiben la activación o maduración de las células dendríticas. Los ARNip y los microARN son bien conocidos en la técnica (Fire et al., Nature 391:806, 1998; véase también "The RNA Interference Resource" of Applied Biosystems, Trang et al., Oncogene Supl 2:S52, 2008; Taganov, K., et al. 2007. Immunity 26:133-137; Dahlberg, J. E. y E. Lund. 2007. Sci. STKE 387:pe25; Tiemann y Rossi, EMBO Mol Med 1: 142, 2009). Como alternativa, la secuencia de interés puede codificar un ARN bicatenario autocomplementario en el que la región complementaria es mayor de aproximadamente 20 ribonucleótidos de longitud, o un ARN antisentido que es mayor de aproximadamente 20 ribonucleótidos de longitud. Los expertos en la materia apreciarán que el ARNip, miARN, las moléculas de ARNbc y ARN antisentido pueden expresarse a partir de un promotor de ARN polimerasa III, o, como alternativa, puede ser un componente de un ARN no codificante que se transcribe desde un promotor de ARN polimerasa II.

Además, la secuencia de interés incluye una secuencia que codifica la IL-12 y además puede incluir secuencias que codifican más de un producto. En algunas configuraciones, la secuencia a entregar puede comprender múltiples genes que codifican al menos una proteína, al menos un ARNip, al menos un microARN, al menos un ARNbc o al menos una molécula de ARN antisentido o cualquiera de sus combinaciones. Por ejemplo, la secuencia a administrar puede incluir IL-12 y uno o más genes que codifican uno o más antígenos contra los cuales se desea una respuesta inmunitaria. Los uno o más antígenos pueden estar asociados con una sola enfermedad o trastorno, o pueden estar asociados con múltiples enfermedades y/o trastornos. En algunos casos, se puede incluir un gen que codifica una proteína reguladora inmunitaria junto con un gen que codifica un antígeno contra el cual se desea una respuesta inmunitaria, y la combinación puede provocar y regular la respuesta inmunitaria a la dirección y magnitud deseadas. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, el vector puede incluir una secuencia que codifica la IL-12, una secuencia que codifica un antígeno y la secuencia que codifica una proteína inmunomoduladora. Los productos pueden producirse como un producto de fusión inicial en el que la secuencia de codificación está en relación funcional con un promotor. Como alternativa, los productos pueden codificarse por separado y cada secuencia codificante en relación funcional con un promotor. Los promotores pueden ser iguales o diferentes.

Tal como se señaló en otra parte, en determinadas realizaciones, los vectores víricos descritos en el presente documento comprenden una secuencia que codifica la IL-12 y una secuencia de interés que codifica uno o más antígenos asociados con la enfermedad o trastorno. Cualquier antígeno que esté asociado con una enfermedad o trastorno puede administrarse a las células dendríticas utilizando las partículas víricas tal como se describe en el presente documento. Se identifica un antígeno asociado con la enfermedad o trastorno. Los antígenos asociados con muchas enfermedades y trastornos son bien conocidos en la técnica. Se puede saber previamente que un antígeno está asociado con la enfermedad o trastorno, o se puede identificar por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede conocerse un antígeno para un tipo de cáncer que padece un paciente, tal como un antígeno asociado a tumor o puede identificarse a partir del tumor en sí mismo mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la materia.

Los antígenos asociados a tumores son conocidos por varios cánceres que incluyen, por ejemplo, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, melanoma y cáncer de mama. En algunos cánceres de mama, por ejemplo, el receptor Her-2 se sobreexpresa en la superficie de las células cancerosas. Los antígenos tumorales a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, fosfatasa ácida prostática, el antígeno específico de la próstata, NKX3.1, antígeno de membrana específico de la próstata, PRAME; BAGE; RAGE; NY-ESO-1, SAGE, HAGE, GAGE, Plu-1, HASH -1, HasH-2, Cripto, Criptin, MART-1/Melan-A, gp100, gp75, mda-7, tirosinasa, proteína relacionada con tirosinasa, p53, Ras, c-Myc, A-Raf, B-Raf y C-Raf, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-

A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, GAGE -2, GAGE -8, GAGE-3, GAGE -4, GAGE -5, GAGE -6, GAGE-7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSM, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, antígeno tumoral de Wilms (WT1), AFP, β -catenina/m, Caspasa-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina/m, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, Anexina II, CDC27/m, TPI/mbc-*abl*, BCR-ABL, factor regulador de interferón 4 (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR, transductor de señal de calcio asociado a tumor 1 (TACSTD1) TACSTD2, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR y EGFRvIII), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR), cinasa unida a integrina (ILK), STAT3, STAT5, STAT6, HIF-1, HIF-2, factor nuclear-Kappa B (NF- κ B), Notch1-4, c-Met, dianas en mamíferos de la rapamicina (mTOR), WNT, PMSA, PR-3, MDM2, mesotelina, carcinoma de células renales - 5T4, SM22-alfa, anhidrasas carbónicas I (CAI) y IX (CAIX) (también conocida como G250), STEAD, TEL/AML1, GD2, proteinase3, hTERT, puntos de corte de translocación de sarcoma, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, ácido polisiálico, MYCN, RhoC, GD3, fucosil GM1, mesotelio, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GloboH, NY-BR-1, RGs5, SART3, STn, PAX5, OY-*TES1*, proteína de esperma 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, legumain, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2 y antígeno 1 relacionado con fos Se han revisado varios antígenos asociados a tumores (véase, por ejemplo, "Tumor-Antigens Recognized By T-Lymphocytes", Boon T, Cerottini J C, Vandeneuynde B, Vanderbruggen P, Vanpel A, Annual Review Of Immunology 12: 337-365, 1994; "A listing of human tumor antigens recognized by T cells", Renkvist N, Castelli C, Robbins P F, Parmiani G. Cancer Immunology Immunotherapy 50: (1) 3-15 MAR 2001,.)

El antígeno también puede ser un antígeno asociado con una enfermedad infecciosa, tal como, por ejemplo, VIH/SIDA. El antígeno puede ser, por ejemplo, gp120 (Klimstra, W. B., et al. 2003. J Virol 77:12022-12032; Bernard, K. A., et al. 2000. Virology 276:93-103; Byrnes, A. P., et al. 1998. J Virol 72: 7349-7356,). Otros antígenos a modo de ejemplo incluyen, aunque sin limitación: gag, pol, env, tat, nef y rev (Lieberman, J. et al. 1997. AIDS Res Hum Retroviruses 13(5): 383-392; Menendez-Arias, L. et al. 1998. Viral Immunol 11 (4): 167-181,).

Los ejemplos de antígenos víricos incluyen, pero sin limitación, polipéptidos de adenovirus, polipéptidos de alfavirus, polipéptidos de calicivirus, por ejemplo, un antígeno de la cápside de calicivirus, polipéptidos de coronavirus, polipéptidos del virus del moquillo, polipéptidos del virus del ébola, polipéptidos de enterovirus, polipéptidos de flavivirus, polipéptidos del virus de la hepatitis (AE), por ejemplo, un antígeno de superficie o núcleo de hepatitis B, o una glicoproteína E1 o E2 del virus de la hepatitis C, proteínas del núcleo o no estructurales, polipéptidos de herpesvirus, por ejemplo, un virus del herpes simple o una glicoproteína del virus varicela zóster, polipéptidos del virus de inmunodeficiencia, por ejemplo, la envoltura o proteasa del virus de inmunodeficiencia humana, polipéptidos del virus de peritonitis infecciosa, polipéptidos del virus de la gripe, por ejemplo, una hemaglutinina de la gripe A, neuraminidasa o nucleoproteína, polipéptidos del virus de la leucemia, polipéptidos del virus de Marburg, polipéptidos de ortomixovirus, polipéptidos del virus del papiloma, polipéptidos del virus parainfluenza, por ejemplo, la hemaglutinina/neuraminidasa, polipéptidos de paramixovirus, polipéptidos de parvovirus, polipéptidos de pestivirus, polipéptidos de picornavirus, por ejemplo, un polipéptido de la cápside del poliovirus, polipéptidos del virus de la viruela, por ejemplo, un polipéptido del virus vaccinia, polipéptidos del virus de la rabia, por ejemplo, una glicoproteína G del virus de la rabia, polipéptidos de reovirus, polipéptidos de retrovirus y polipéptidos de rotavirus.

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

Los ejemplos de antígenos fúngicos incluyen, pero sin limitación, polipéptidos de Absidia, polipéptidos de Acremonium, polipéptidos de Alternaria, polipéptidos de Aspergillus, polipéptidos de Basidiobolus, polipéptidos de Bipolaris, polipéptidos de Blastomyces, polipéptidos de Candida, polipéptidos de Coccidioides, polipéptidos de Conidiobolus, polipéptidos de Cryptococcus, polipéptidos de Curvalaria, polipéptidos de Epidermophyton, polipéptidos de Exophiala, polipéptidos de Geotrichum, polipéptidos de Histoplasma, polipéptidos de Madurella, polipéptidos de Malassezia, polipéptidos de Microsporium, polipéptidos de Moniliella, polipéptidos de Mortierella, polipéptidos de Mucor, polipéptidos de Paecilomyces, polipéptidos de Penicillium, polipéptidos de Phialemonium, polipéptidos de Phialophora, polipéptidos de Prototeca, polipéptidos de Pseudallescheria, polipéptidos de Pseudomicrodochium, polipéptidos de Pythium, polipéptidos de Rhinosporidium, polipéptidos de Rhizopus,

polipéptidos de *Scolecobasidium*, polipéptidos de *Sporothrix*, polipéptidos de *Stemphylium*, polipéptidos de *Trichophyton*, polipéptidos de *Trichosporon* y polipéptidos de *Xylohypha*.

5 Los ejemplos de antígenos de parásitos protozoarios incluyen, pero sin limitación, polipéptidos de *Babesia*, polipéptidos de *Balantidium*, polipéptidos de *Besnoitia*, polipéptidos de *Cryptosporidium*, polipéptidos de *Eimeria*, polipéptidos de *Encephalitozoon*, polipéptidos de *Entamoeba*, polipéptidos de *Giardia*, polipéptidos de *Hammondia*, polipéptidos de *Hepatozoon*, polipéptidos de *Isospora*, polipéptidos de *Leishmania*, polipéptidos de *Microsporidia*, polipéptidos de *Neospora*, polipéptidos de *Nosema*, polipéptidos de *Pentatrichomonas*, polipéptidos de *Plasmodium*, por ejemplo, circunsporozoíto de *P. falciparum* (PfCSP), proteína de superficie de esporozoíto 2 (PfSSP2), extremo carboxilo terminal del antígeno 1 del estado hepático (c-terminal de PfLSA1) y proteína exportada 1 (PfExp-1), polipéptidos de *Pneumocystis*, polipéptidos de *Sarcocystis*, polipéptidos de *Schistosoma*, polipéptidos de *Theileria*, polipéptidos de *Toxoplasma* y polipéptidos de *Trypanosoma*.

15 Los ejemplos de antígenos de parásitos helmintos incluyen, pero sin limitación, polipéptidos de *Acanthocheilonema*, polipéptidos de *Aelurostrongylus*, polipéptidos de *Ancylostoma*, polipéptidos de *Angiostrongylus*, polipéptidos de *Ascaris*, polipéptidos de *Brugia*, polipéptidos de *Bunostomum*, polipéptidos de *Capillaria*, polipéptidos de *Chabertia*, polipéptidos de *Cooperia*, polipéptidos de *Crenosoma*, polipéptidos de *Dictyocaulus*, polipéptidos de *Diectophyme*, polipéptidos de *Dipetalonema*, polipéptidos de *Diphyllobothrium*, polipéptidos de *Diplydium*, polipéptidos de *Dirofilaria*, polipéptidos de *Dracunculus*, polipéptidos de *Enterobius*, polipéptidos de *Filaroides*, polipéptidos de *Haemonchus*, polipéptidos de *Lagochilascaris*, polipéptidos de *Loa*, polipéptidos de *Mansonella*, polipéptidos de *Muellerius*, polipéptidos de *Nanophyetus*, polipéptidos de *Necator*, polipéptidos de *Nematodirus*, polipéptidos de *Oesophagostomum*, polipéptidos de *Onchocerca*, polipéptidos de *Opisthorchis*, polipéptidos de *Ostertagia*, polipéptidos de *Parafilaria*, polipéptidos de *Paragonimus*, polipéptidos de *Parascaris*, polipéptidos de *Physaloptera*, polipéptidos de *Protostrongylus*, polipéptidos de *Setaria*, polipéptidos de *Spirocerca*, polipéptidos de *Spirometra*, polipéptidos de *Stephanofilaria*, polipéptidos de *Strongyloides*, polipéptidos de *Strongylus*, polipéptidos de *Thelazia*, polipéptidos de *Toxascaris*, polipéptidos de *Toxocara*, polipéptidos de *Trichinella*, polipéptidos de *Trichostrongylus*, polipéptidos de *Trichuris*, polipéptidos de *Uncinaria* y polipéptidos de *Wuchereria*.

30 Los ejemplos de antígenos de ectoparásitos incluyen, pero sin limitación, polipéptidos (incluidos antígenos protectores, así como alérgenos) de pulgas; garrapatas, incluyendo garrapatas duras y garrapatas suaves; moscas, como jejenes, mosquitos, moscas de la arena, moscas negras, tábanos, moscas de los cuernos, moscas del venado, moscas tsetsé, moscas del establo, moscas que causan miasis y mosquitos picadores; hormigas; arañas, piojos; ácaros; y hemípteros, tales como chinches de cama y chinches del beso.

35 Una vez que se ha identificado y seleccionado un antígeno, se identifica una secuencia que codifica el antígeno deseado. Preferentemente, la secuencia comprende un ADNc. Las secuencias luego se clonaron en el genoma del vector vírico usando metodologías convencionales conocidas en la técnica.

40 En determinadas configuraciones, los vectores contienen secuencias de polinucleótidos que codifican moléculas inmunomoduladoras. Las moléculas inmunomoduladoras a modo de ejemplo incluyen cualquiera de varias citocinas. Por "citocina", tal como se usa en el presente documento, se entiende un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen hormonas del crecimiento, tal como la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento humana con N-metionilo y la hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glucoproteicas, tales como la hormona folículo estimulante (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora de mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-beta; factor de crecimiento procedente de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como el interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11; IL-15, un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando de kit (KL). Otras moléculas inmunomoduladoras contempladas para su uso en el presente documento incluyen B7.1, B7.2, 4-1BB, ligando CD40 (CD40L), CD40 inducible por fármacos (ICD40) y similares. En determinadas realizaciones, estos polinucleótidos están normalmente bajo el control de uno o más elementos reguladores que dirigen la expresión de las secuencias codificantes en las células dendríticas.

65 En determinadas realizaciones, la molécula inmunomoduladora codificada por los vectores que expresan IL-12 descritos en el presente documento es una molécula inhibidora del punto de control. Los puntos de control inmunitarios se refieren a varias vías inhibitorias del sistema inmunitario que son cruciales para mantener la autotolerancia y para modular la duración y amplitud de las respuestas inmunitarias. Los tumores usan ciertas vías de punto de control inmunitario como un mecanismo principal de resistencia inmunitaria, particularmente contra los

linfocitos T que son específicos para antígenos tumorales. (Véase, por ejemplo, Pardoll, 2012 Nature 12:252; Chen y Mellman 2013 Immunity 39:1). La presente divulgación proporciona vectores que codifican inhibidores del punto de control inmunitario. Los inhibidores del punto de control inmunitario incluyen cualquier agente que bloquee o inhiba de manera estadísticamente significativa, las vías inhibitoras del sistema inmunitario. Tales inhibidores pueden incluir anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen y bloquean o inhiben los receptores del punto de control inmunitario o los anticuerpos que se unen y bloquean o inhiben los ligandos del receptor del punto de control inmunitario. Las moléculas de punto de control inmunitario ilustrativas que se pueden direccionar para el bloqueo o la inhibición incluyen, pero sin limitación, CTLA-4, 4-1BB (CD137), 4-1BBL (CD137L), PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4 (pertenece a la familia de moléculas de CD2 y se expresa en todos los linfocitos T NK, $\gamma\delta$, y CD8+ de memoria ($\alpha\beta$)), CD160 (también denominado BY55) y CGEN-15049. Los inhibidores del punto de control inmunitario incluyen anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, u otras proteínas de unión, que se unen y bloquean o inhiben la actividad de uno o más de CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4, CD160 y CGEN-15049. Los inhibidores del punto de control inmunitario ilustrativos incluyen cualquiera de los siguientes anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos: Tremelimumab (anticuerpo bloqueante CTLA-4), anti-OX40, anticuerpo monoclonal PD-L1 (Anti-B7-H1; MEDI4736), MK-3475 (pembrolizumab; bloqueador PD-1), Nivolumab (anticuerpo anti-PD1), CT-011 (anticuerpo anti-PD1), anticuerpo monoclonal BY55, AMP224 (anticuerpo anti-PDL1), BMS-936559 (anticuerpo anti-PDL1), MPDL3280A (atezolizumab; anticuerpo anti-PDL1), MSB0010718C (anticuerpo anti-PDL1) y Yervoy/ipilimumab (inhibidor de punto de control anti-CTLA-4).

Una secuencia que codifica un producto detectable, generalmente una proteína, se puede incluir para permitir la identificación de células que expresan el producto deseado. Por ejemplo, una proteína marcadora fluorescente, tal como la proteína verde fluorescente (GFP), se incorpora a la construcción junto con una secuencia de interés (por ejemplo, que codifica un antígeno). En otros casos, la proteína puede ser detectable por un anticuerpo o la proteína puede ser una enzima que actúa sobre un sustrato para producir un producto detectable, o un producto que permite la selección de una célula diana transfectada o transducida, por ejemplo confiere resistencia a los fármacos, tal como la resistencia a la higromicina. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas adecuadas para su uso en células eucariotas, por ejemplo, neomicina, metotrexato, blasticidina, entre otros conocidos en la técnica, o complementan las deficiencias auxotróficas, o suministran nutrientes críticos retenidos de los medios. El marcador seleccionable puede estar presente opcionalmente en un plásmido separado e introducido por cotransfección.

Se pueden utilizar una o más unidades de expresión multicistricas que incluyen dos o más de los elementos (por ejemplo, secuencia(s) de interés, la molécula de la envoltura, factores de maduración de CD) necesarios para la expresión de múltiples secuencias de interés en una célula diana, o para la expresión de proteínas accesorias necesarias para la producción del virus deseado en las células de empaquetamiento. El uso de vectores multicistricos reduce el número total de moléculas de ácido nucleico requeridas y, por lo tanto, evita las posibles dificultades asociadas con la coordinación de la expresión de múltiples genomas de vectores. En un vector multicistrico, los diversos elementos que se van a expresar están operativamente unidos a uno o más promotores (y otros elementos de control de la expresión según sea necesario). En algunas configuraciones, un vector multicistrico comprende una secuencia de interés, una secuencia que codifica un producto reportero y elementos víricos. La secuencia de interés incluye IL-12 y opcionalmente también codifica un antígeno y, en ciertas realizaciones también puede incluir una molécula inmunoestimuladora adicional, inhibidor del punto de control u otra citocina. En ocasiones, el vector multicistrico comprende un gen que codifica la IL-12, un antígeno, un gen que codifica otra molécula inmunoestimuladora y elementos víricos.

Cada componente que se expresará en un vector de expresión multicistrico puede separarse, por ejemplo, por un elemento de sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés) o un elemento vírico 2A, para permitir la expresión separada de las diversas proteínas del mismo promotor. Los elementos IRES y los elementos 2A se conocen en la técnica (Patente de EE.UU. N.º 4.937.190; de Felipe et al. 2004. Traffic 5: 616-626.). En una realización, oligonucleótidos que codifican secuencias del sitio de escisión de furina (RAKR) (Fang et al. 2005. Nat. Biotech 23: 584-590,) unidos con secuencias similares a 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la rinitis equina A (ERAV) y el thosa asigna virus (TaV) (Szymczak et al. 2004. Nat. Biotechnol. 22: 589-594,) se usan para separar elementos genéticos en un vector multicistrico. La eficacia de un vector multicistrico particular puede probarse fácilmente detectando la expresión de cada uno de los genes usando protocolos estándar.

En determinadas realizaciones, cuando múltiples secuencias de interés (por ejemplo, IL-12 y uno o más antígenos de interés, y/o una o más moléculas inmunoestimuladoras adicionales, y/o un inhibidor de punto de control, etc.) se contemplan para la expresión en células diana, se pueden usar múltiples vectores donde cada vector expresa una o más de las secuencias de interés. En una realización particular, un vector retrovírico expresa IL-12 y puede usarse esencialmente como un vector adyuvante en combinación con uno o más de otros vectores. En este sentido, un vector retrovírico expresa IL-12 y un vector retrovírico separado puede expresar uno o más antígenos de interés contra los cuales se desea una respuesta inmunitaria. En otra realización, se puede generar un vector retrovírico que expresa IL-12 para su uso con un vector retrovírico separado que expresa uno o más antígenos y/o una o más moléculas inmunoestimuladoras adicionales y/o un inhibidor de punto de control. Por lo tanto, cuando se contemplan

múltiples secuencias de interés, pueden proporcionar en el mismo o en vectores separados.

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

La construcción del genoma del vector puede lograrse usando cualquier técnica de ingeniería genética conocida en la materia, incluyendo, sin limitación, las técnicas convencionales de digestión con endonucleasa de restricción, ligamiento, transformación, purificación de plásmidos y secuenciación de ADN, por ejemplo tal como se describe en Sambrook et al. (1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.), Coffin et al. (Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1997)) y "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000)).

C. Producción de partículas víricas

Se puede usar cualquiera de varios métodos ya conocidos en la técnica para producir partículas lentivíricas infecciosas cuyo genoma comprende una copia de ARN del genoma del vector vírico. En un método, el genoma del vector vírico se introduce en una línea celular de empaquetamiento que contiene todos los componentes necesarios para empaquetar el ARN genómico del virus, transcrito del genoma del vector vírico, en partículas víricas. Como alternativa, el genoma del vector vírico puede comprender uno o más genes que codifican componentes víricos además de las una o más secuencias de interés. Para evitar la replicación del genoma en la célula diana, sin embargo, los genes víricos endógenos necesarios para la replicación generalmente se eliminarán y se proporcionarán por separado en la línea celular de empaquetamiento.

En general, las partículas del vector lentivírico son producidas por una línea celular que se transfecta con uno o más vectores plasmídicos que contienen los componentes necesarios para generar las partículas. Estas partículas del vector lentivírico generalmente no son competentes en replicación, es decir, solo son capaces de una sola ronda de infección. Con mucha frecuencia, se utilizan múltiples vectores plasmídicos para separar los diversos componentes genéticos que generan las partículas del vector lentivírico, principalmente para reducir la posibilidad de eventos de recombinación que de otro modo podrían generar virus competentes de replicación. Sin embargo, si se desea, se puede usar un solo vector plasmídico que tiene todos los componentes lentivíricos. Como un ejemplo de un sistema que emplea múltiples vectores plasmídicos, una línea celular se transfecta con al menos un plásmido que contiene el genoma del vector vírico (es decir, el plásmido del genoma del vector), incluidos las LTR, la secuencia de empaquetamiento de acción en cis y la(s) secuencia(s) de interés, que a menudo están operativamente unidas a un promotor heterólogo, al menos un plásmido que codifica los componentes enzimáticos y estructurales del virus (es decir, el plásmido de empaquetado que codifica componentes como, Gag y Pol), y al menos un plásmido de envoltura que codifica una glicoproteína de envoltura de Arbovirus. Se pueden usar plásmidos adicionales para mejorar la producción de partículas de retrovirus, por ejemplo, plásmidos de expresión de rev, tal como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica. Las partículas víricas brotan a través de la membrana celular y comprenden un núcleo que incluye un genoma que contiene la secuencia de interés y una glicoproteína de la envoltura de Arbovirus que se dirige a las células dendríticas. Cuando la glicoproteína del Arbovirus es la glicoproteína E2 del virus Sindbis, la glicoproteína está diseñada para reducir la unión al heparán sulfato en comparación con la cepa de referencia HR.

La transfección de células de empaquetamiento con vectores plasmídicos de la presente invención se puede lograr mediante métodos bien conocidos, y el método a utilizar no está limitado de ninguna manera. En la técnica se conocen varios sistemas de administración no víricos, incluyendo, por ejemplo, electroporación, sistemas de administración basados en lípidos, incluidos liposomas, suministro de ADN "desnudo" y suministro mediante compuestos de policiclodextrina, tales como los descritos en Schatzlein AG. (2001. *Non-Viral Vectors in Cancer Gene Therapy: Principles and Progresses*. Anticancer Drugs,). Los métodos de tratamiento de lípidos catiónicos o sales se emplean normalmente, véase, por ejemplo, Graham et al. (1973. *Virology* 52:456; Wigler et al. (1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 76:1373-76)). El método de precipitación con fosfato de calcio se usa con mayor frecuencia. Sin embargo, también se pueden usar otros métodos para introducir el vector en las células, incluyendo microinyección nuclear y fusión de protoplastos bacterianos.

La línea celular de empaquetamiento proporciona los componentes, incluyendo proteínas reguladoras y estructurales víricas, que se requieren en *trans* para el empaquetamiento del ARN genómico vírico en partículas de vectores lentivíricos. La línea celular de empaquetamiento puede ser cualquier línea celular que sea capaz de expresar proteínas lentivíricas y producir partículas de vectores lentivíricos funcionales. Algunas líneas celulares de empaquetamiento adecuadas incluyen células 293 (ATCC CCL X), 293T, HeLa (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) y Cf2Th (ATCC CRL 1430). La línea celular de empaquetamiento puede expresar de manera estable las proteínas víricas necesarias. Tal línea celular de

empaquetamiento se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 6.218.181. Como alternativa, una línea celular de empaquetamiento puede transfectarse transitoriamente con moléculas de ácido nucleico que codifican una o más proteínas víricas necesarias junto con el genoma del vector vírico. Las partículas víricas resultantes se recogen y se usan para infectar una célula diana. Los genes que codifican las glicoproteínas de la envoltura generalmente se clonan en un vector de expresión, tal como pcDNA3 (Invitrogen, CA EE.UU.). Los vectores de expresión de células eucariotas son bien conocidos en la técnica y están disponibles en varias fuentes comerciales. Las células de empaquetamiento, tales como las células 293T se cotransfectan luego con el genoma del vector vírico que codifica una secuencia de interés (por ejemplo, IL-12, opcionalmente uno o más antígenos, citocinas adicionales), al menos un plásmido que codifica los componentes de empaquetamiento del virus y un vector para la expresión de la molécula de direccionamiento. La envoltura se expresa en la membrana de la célula de empaquetamiento y se incorpora al vector vírico.

En un escenario, se usan uno o más vectores para introducir secuencias de polinucleótidos en una línea celular de empaquetamiento para la preparación de una partícula de vector lentivírico pseudotipada con una glicoproteína de envoltura del virus Sindbis tal como E2, como se describe en el presente documento. Los vectores pueden contener secuencias de polinucleótidos que codifican los diversos componentes del virus, incluida la envoltura del virus Sindbis, una secuencia o secuencias de interés (por ejemplo, IL-12 y opcionalmente uno o más antígenos u otras secuencias de interés), y cualquier componente necesario para la producción del virus que no es proporcionado por la célula de empaquetamiento.

En otros escenarios, las células de empaquetamiento se cotransfectan con un genoma de vector vírico que codifica la IL-12 y uno o más vectores adicionales. Por ejemplo, además del vector vírico que codifica la IL-12 (y opcionalmente una o más secuencias adicionales de interés), un segundo vector preferentemente lleva los genes que codifican una envoltura de virus Sindbis modificada (también llamada variante). En algunas situaciones, el genoma del vector vírico que codifica la IL-12 también incluye una secuencia de polinucleótidos que codifica moléculas inmunomoduladoras adicionales seleccionadas, incluyendo ejemplos no limitativos de una quimiocina, una citocina, un factor de maduración de CD o un factor que regula los mecanismos de control inmunitario. En otras situaciones, la secuencia de polinucleótidos que codifica un factor inmunomodulador seleccionado está contenida en un tercer vector que se cotransfecta con el vector vírico que codifica la IL-12 y los uno o más vectores adicionales en las células de empaquetamiento.

En algunas o en cualquier realización, las partículas del vector lentivírico descritas en el presente documento comprenden un inhibidor de SAMHD1. En determinadas realizaciones, el inhibidor de SAMHD1 es una proteína Vpx o una proteína Vpr. En determinadas realizaciones, las partículas del vector lentivírico descritas en el presente documento comprenden una proteína Vpx o una variante de la misma (véase, por ejemplo, el documento WO2013/149167). En algunas o en cualquier realización, la variante conserva la capacidad de inhibir SAMHD1.

La proteína de la envoltura del virus Sindbis contiene cuatro glucanos N-ligados: dos en la proteína E2 y dos en la proteína E1. Dos N-glucanos del virus producido en células de mamíferos en ausencia de un inhibidor de manosidasa I tienen una estructura rica en manosa (un glicano N-ligado E2 y un glicano N-ligado E1), mientras que los dos restantes tienen una estructura compleja. Los dos N-glicanos de estructura compleja están expuestos en la superficie de la proteína de la envoltura, mientras que los dos N-glicanos de estructura rica en manosa están introducidos en el centro del trímero de las proteínas de la envoltura. Las partículas del virus Sindbis con glicanos complejos N-ligados no se unen a DC-SIGN de forma tan eficaz como las partículas con glicoproteínas menos complejas y altamente manosiladas.

En determinadas realizaciones, las partículas víricas se producen en células de mamíferos en presencia del inhibidor de manosidasa I, tal como kifunensina (véase, por ejemplo, el documento WO2013/149167). Por lo tanto, en algunas o en cualquier realización, una célula de empaquetamiento del virus se cultiva en presencia de un inhibidor de manosidasa I. En algunas o en cualquier realización, el inhibidor de manosidasa I es la kifunensina. En algunas realizaciones, la kifunensina está presente en los medios a una concentración de aproximadamente 0,01 µg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 9 µg/ml, aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 8 µg/ml, aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 7 µg/ml, aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 6 µg/ml, aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 4 µg/ml, aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 3 µg/ml, aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 2 µg/ml, aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 1 µg/ml, aproximadamente 0,25 µg/ml a aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 0,25 µg/ml a aproximadamente 9 µg/ml, aproximadamente 0,25 µg/ml a aproximadamente 8 µg/ml, aproximadamente 0,25 µg/ml a aproximadamente 7 µg/ml, aproximadamente 0,25 µg/ml a aproximadamente 6 µg/ml, aproximadamente 0,25 µg/ml a aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 0,25 µg/ml a aproximadamente 4 µg/ml, aproximadamente 0,25 µg/ml a aproximadamente 3 µg/ml, aproximadamente 0,25 µg/ml a aproximadamente 2 µg/ml, o aproximadamente 0,25 µg/ml a aproximadamente 1 µg/ml.

En algunas o cualquiera de las realizaciones en las que una partícula de vector lentivírico pseudotipado comprende una glicoproteína E2 del virus Sindbis y una proteína Vpx, las partículas lentivíricas se producen en presencia de un inhibidor de manosidasa I. En algunas realizaciones, el inhibidor de manosidasa es la desoximanojirimicina (DMNJ).

En algunas realizaciones preferidas, el inhibidor de manosidasa es la kifunensina. En algunas realizaciones, la DMNJ está presente en los medios a una concentración de aproximadamente 1,0 µg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, aproximadamente 1,0 µg/ml a aproximadamente 900 µg/ml, aproximadamente 1,0 µg/ml a aproximadamente 800 µg/ml, aproximadamente 1,0 µg/ml a aproximadamente 700 µg/ml, aproximadamente 1,0 µg/ml a aproximadamente 600 µg/ml, aproximadamente 1,0 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, aproximadamente 1,0 µg/ml a aproximadamente 400 µg/ml, aproximadamente 1,0 µg/ml a aproximadamente 300 µg/ml, aproximadamente 1,0 µg/ml a aproximadamente 200 µg/ml, aproximadamente 100 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 400 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 300 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 200 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml, aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 400 µg/ml, aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 300 µg/ml, aproximadamente 100 µg/ml a aproximadamente 200 µg/ml, aproximadamente 200 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml, o aproximadamente 200 µg/ml a aproximadamente 400 µg/ml.

En algunas o en cualquier realización, una partícula de vector lentivírico pseudotipada producida en presencia de un inhibidor de manosidasa I (por ejemplo, kifunensina) comprende una glicoproteína de envoltura (por ejemplo, E2 del virus Sindbis), en donde al menos el 60 % de los glicanos N-ligados comprenden una estructura de manos₅ (Man₅), Man₆, Man₇, Man₈ y/o de Man₉. En algunas realizaciones, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos el 99 % o el 100 % de los glicanos N-ligados comprenden una estructura de Man₅, Man₆, Man₇, Man₈ y/o de Man₉+

En un escenario, se usan uno o más vectores para introducir secuencias de polinucleótidos en una línea celular de empaquetamiento para la preparación de una partícula de vector lentivírico pseudotipada con una glicoproteína de envoltura del virus Sindbis tal como E2, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la partícula del vector lentivírico está altamente manosilada. En algunas realizaciones, la partícula del vector lentivírico también comprende una proteína Vpx o una variante de la misma. En otras realizaciones más, la partícula del vector lentivírico está altamente manosilada y comprende una proteína Vpx o una variante de la misma. Los vectores pueden contener secuencias de polinucleótidos que codifican los diversos componentes del virus, incluida la envoltura del virus Sindbis, una secuencia(s) de interés (que generalmente codifica un antígeno) y cualquier componente necesario para la producción del virus que no es proporcionado por la célula de empaquetamiento.

El perfil de glicosilación de una proteína de envoltura vírica se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se pueden comparar los ensayos de cambio de gel en glicoproteínas víricas tratadas con glucosidasas (por ejemplo, EndoH o PNGasaF) o no tratadas. Otros métodos incluyen escindir los glicanos de las glicoproteínas víricas y separar e identificar los componentes mediante HPLC y métodos de espectrometría de masas.

La producción de virus se mide tal como se describe en el presente documento y se expresa como IU por volumen. IU es unidad infecciosa o, como alternativa, unidades de transducción (UT); IU y UT se pueden usar indistintamente como una medida cuantitativa del título de una preparación de partículas de vectores víricos. Tal como se describe en el presente documento, se produce un virus en el que el genoma puede expresarse un producto que se puede medir fácilmente. Se prefiere una proteína fluorescente, una proteína verde fluorescente. El vector lentivírico es normalmente no integrante. El virus luego se administra a las células diana y se determina el número de células diana que expresan GFP, como por citometría de flujo. Luego se calcula el título. El título es preferentemente lo más alto posible, pero al menos 1×10^5 IU/ml, al menos 3×10^5 IU/ml, al menos 1×10^6 IU/ml, al menos 3×10^6 IU/ml, o al menos 1×10^7 IU/ml de sobrenadante celular (antes de cualquier concentración). Como alternativa, el título es al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 % del título del mismo vector lentivírico pseudotipado en las mismas células con envoltura VSV-G.

D. Administración del virus

El virus puede administrarse a una célula diana de cualquier manera que permita que el virus entre en contacto con las células dendríticas (CD) diana en las que se desea la administración de un polinucleótido que codifica la IL-12 y cualquier otro polinucleótido de interés. En ocasiones, se introducirá una cantidad adecuada de virus en un humano u otro animal directamente (*in vivo*), por ejemplo, a través de inyección en el cuerpo. Los animales adecuados incluyen, sin limitación, caballos, perros, gatos, ganado bovino, cerdos, ovejas, conejos, pollos u otras aves. Las partículas víricas y otros agentes terapéuticos desvelados en el presente documento pueden inyectarse por varias vías, tales como intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraganglionar, cavidad intraperitoneal o mucosa. El virus puede administrarse usando un dispositivo de inyección subdérmica, como los dispositivos descritos en las patentes de EE.UU. N.º 7.241.275, 7.115.108, 7.108.679, 7.083.599, 7.083.592, 7.047.070, 6.971.999, 6.808.506, 6.780.171, 6.776.776, 6.689.118, 6.670.349, 6.569.143, 6.494.865, 5.997.501, 5.848.991, 5.328.483, 5.279.552, 4.886.499. En una realización particular, el virus se administra por vía intratumoral. Otras ubicaciones de inyección también son adecuadas, tales como directamente en órganos que comprenden células diana. Por ejemplo, se puede usar una inyección intraganglio linfático, una inyección intrabazo o una inyección intramédula ósea para administrar el virus al

ganglio linfático, al bazo y a la médula ósea, respectivamente. Dependiendo de las circunstancias particulares y la naturaleza de las células diana, la introducción puede llevarse a cabo a través de otros medios, por ejemplo, inhalación o contacto directo con tejidos epiteliales, por ejemplo, los del ojo, la boca o la piel.

5 Como se observa en otra parte en el presente documento, en ciertas realizaciones donde se contemplan múltiples secuencias de interés para la expresión en células diana, las secuencias de interés se pueden expresar a partir del mismo vector o se pueden proporcionar en vectores separados. En este sentido, se contempla la administración de múltiples vectores. En determinadas realizaciones, cada vector se administra por la misma vía. En otras realizaciones, cada vector se puede administrar por una vía diferente y en un momento diferente. En una realización, cada vector se administra por la misma vía pero a una dosis diferente y en un momento diferente. En una realización adicional, cada vector se administra por la misma vía y al mismo tiempo, en el mismo sitio o en sitios diferentes, y en la misma dosis o en diferentes dosis. En otra realización, cada vector se administra por la misma vía y al mismo tiempo, pero cada vector se administra a una dosis diferente.

15 Como ejemplo, un vector que expresa IL-12 se puede administrar por vía intratumoral de manera concurrente con un vector separado que expresa un antígeno de interés. En un ejemplo adicional, un vector que expresa IL-12 se puede administrar por vía intratumoral de manera concurrente con un vector separado que expresa uno o más antígenos de interés y opcionalmente una o más secuencias adicionales de interés. En una realización adicional, se administra por vía intratumoral un vector que expresa IL-12 y uno o más antígenos de interés. En una realización adicional, se administra por vía intratumoral un vector que expresa IL-12 y un vector separado que expresa uno o más antígenos de interés de manera concurrente en un sitio separado, ya sea por vía intratumoral en un tumor diferente, o en un sitio diferente y a través de una vía diferente (por ejemplo, subcutánea, intradérmica o intramuscular). En otras realizaciones, se puede administrar por vía intratumoral un vector que expresa IL-12 y un vector separado que expresa uno o más antígenos de interés puede administrarse antes o después del vector que expresa IL-12, ya sea en el mismo sitio o en un sitio diferente. En este sentido, los dos vectores se pueden administrar en diferentes sitios y usando diferentes dosis. En ciertas realizaciones en donde un vector que expresa IL-12 y un vector separado que expresa uno o más antígenos y/o que comprenden otras secuencias de interés se administran de manera concurrente, puede ser ventajoso mezclar las composiciones que comprenden los vectores separados en una sola dosis de administración.

30 Como alternativa, se proporcionan células diana y se ponen en contacto con el virus *in vitro*, tal como en placas de cultivo. Las células diana son normalmente poblaciones de células que comprenden células dendríticas obtenidas de un sujeto sano o un sujeto que necesita tratamiento o en quienes se desea estimular una respuesta inmunitaria a un antígeno. Los métodos para obtener células de un sujeto son bien conocidos en la técnica e incluyen flebotomía, escisión quirúrgica y biopsia. Las CD humanas también se pueden generar obteniendo progenitores hematopoyéticos humanos CD34 α + y usando un método de cultivo *in vitro* tal como se describe en otra parte (por ejemplo, Banchemereau et al. Cell 106, 271-274 (2001)).

40 El virus puede estar suspendido en los medios y agregarse a los pocillos de una placa de cultivo, tubo u otro recipiente. Los medios que contienen el virus pueden agregarse antes de la colocación en placa de las células o después de que las células se hayan colocado en placa. Las células se incuban normalmente en una cantidad apropiada de medio para proporcionar viabilidad y que permitan concentraciones adecuadas de virus en los medios de modo que se produzca la transducción de la célula diana. Las células se incuban preferentemente con el virus durante una cantidad de tiempo suficiente para permitir que el virus infecte las células. Preferentemente, las células se incuban con virus durante al menos 1 hora, al menos 5 horas o al menos 10 horas.

50 Tanto en la administración *in vivo* como *in vitro*, se puede usar una alícuota de partículas víricas que contienen un número suficiente para infectar las células diana deseadas. Cuando se va a cultivar la célula diana, la concentración de las partículas víricas es generalmente de al menos 1 UI/ μ l, más preferentemente al menos 10 UI/ μ l, incluso más preferentemente al menos 300 UI/ μ l, incluso más preferentemente al menos 1X10⁴ UI/ μ l, incluso más preferentemente al menos 1X10⁵ UI/ μ l, incluso más preferentemente al menos 1X10⁶ UI/ μ l, o incluso más preferentemente al menos 1X10⁷ UI/ μ l

55 Después de la infección con el virus *in vitro*, las células diana se pueden introducir (o reintroducir) en un ser humano u otro animal. Las células se pueden introducir en la dermis, debajo de la dermis o en el torrente sanguíneo periférico. Las células introducidas en un animal son preferentemente células que provienen de ese animal, para evitar una respuesta inmunitaria adversa. También se pueden usar células que provienen de un donante que tenga un fondo inmunitario similar. Otras células que también se pueden usar incluyen aquellas diseñadas para evitar una respuesta inmunológica adversa.

60 Las células diana se pueden analizar para la integración, la transcripción y/o la expresión de la secuencia o gen(es) de interés, el número de copias del gen integrado y la ubicación de la integración, por ejemplo. Dicho análisis se puede llevar a cabo en cualquier momento y se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido en la materia.

65 Los sujetos en los que se administra un virus o células dendríticas infectadas con virus se pueden analizar para

determinar la ubicación de las células infectadas, la expresión del polinucleótido o gen de interés administrado por virus, la estimulación de una respuesta inmunitaria, y monitorizado para detectar síntomas asociados con una enfermedad o trastorno mediante cualquier método conocido en la técnica.

5 Los métodos de infectar células desvelados anteriormente no dependen de las características individuales específicas de las células. Como resultado, se extienden fácilmente a varias especies animales. En algunos casos, las partículas víricas se administran a un humano o a células dendríticas humanas, y en otros casos se administran a un animal tal como un ratón, caballo, perro, gato, ratón o a aves. Tal como se trata en el presente documento, el
10 genoma del vector vírico está pseudotipado para conferirle un amplio intervalo de hospedadores, así como la especificidad de la célula diana. Un experto en la materia también sería consciente de los promotores internos apropiados y otros elementos para lograr la expresión deseada de una secuencia de interés en una especie animal particular. Por lo tanto, un experto en la materia podrá modificar el método de infectar células dendríticas de cualquier especie.

15 E. Administraciones terapéuticas y profilácticas

Las células diana se pueden infectar con una partícula de vector de lentivirus tal como se describe en el presente documento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno, particularmente aquellos para los cuales la inducción de una respuesta inmunitaria influenciada por IL-12 en un paciente sería beneficiosa. En
20 realizaciones particulares, las células dendríticas se pueden infectar con una partícula de vector de lentivirus tal como se describe en el presente documento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno, en particular, aquellos para los cuales la activación de una respuesta inmunitaria en un paciente sería beneficiosa. Muchas de esas enfermedades son bien conocidas. Por ejemplo, las enfermedades o trastornos que son susceptibles de tratamiento o prevención mediante los métodos de la presente invención incluyen, cánceres. En un
25 método, una enfermedad se trata por partículas víricas descritas en el presente documento para administrar una secuencia de interés a las células dendríticas, en donde la expresión de la secuencia de interés produce IL-12 y opcionalmente un antígeno específico de la enfermedad y conduce a la estimulación de las respuestas inmunitarias celulares y las respuestas inmunitarias humorales. En determinadas realizaciones, la IL-12 se expresa junto con una secuencia de interés que codifica uno o más antígenos contra los cuales se desea una respuesta inmunitaria, pero
30 que normalmente no se expresa en una célula dendrítica. El(los) antígeno(s) se expresa(n) y se presenta(n) por la célula dendrítica. El genoma del vector vírico puede codificar además una molécula inmunoestimuladora adicional u otras moléculas inmunomoduladoras tales como un inhibidor del punto de control.

En un uso típico, las partículas víricas administran a las células diana secuencias que codifican IL-12 y, en determinadas realizaciones, la IL-12 en combinación con uno o más antígenos, ya sea expresado por el mismo
35 vector o por un vector separado. La administración se puede lograr poniendo en contacto las células dendríticas con el virus *in vitro*, después de lo cual las células dendríticas infectadas se proporcionan a un paciente. Otras veces, se puede lograr la administración administrando el virus a un sujeto para infectar células dendríticas *in vivo*. Las células dendríticas producen IL-12, lo que desencadena respuestas celulares a IL-12, incluida la inducción de linfocitos T CD8, un aumento en los linfocitos B y los linfocitos T CD4 y la inducción de una respuesta TH1, entre otras actividades biológicas inducidas por la IL-12. En determinadas realizaciones, un vector lentivírico dirigido a CD que expresa IL-12 se administra por vía intratumoral y, por lo tanto, desencadena la inducción de una respuesta Th1,
40 entre otras actividades biológicas, y proporciona actividad terapéutica antitumoral. En determinadas realizaciones, la administración intratumoral de un vector lentivírico dirigido a CD que expresa IL-12 junto con un vector que expresa uno o más antígenos también estimula los linfocitos T o linfocitos B específicos de antígeno, en un paciente para inducir respuestas inmunitarias celulares y humorales al antígeno expresado. De tal manera, un paciente que padece una enfermedad o trastorno se trata generando células inmunitarias con una especificidad deseada.

En determinadas realizaciones, un vector que expresa IL-12 se puede administrar por vía intratumoral. La presente divulgación muestra inesperadamente que la inyección intratumoral del vector lentivírico que expresa bajos niveles de IL-12 fue terapéuticamente eficaz en múltiples modelos probados. En particular, los experimentos mostraron que incluso una sola inyección intratumoral de CD dirigida a un vector lentivírico que expresaba bajos niveles de IL-12 tal como se describe en el presente documento era terapéuticamente eficaz. Otros estudios en la técnica requieren múltiples inyecciones de IL-12 con electroporación y requieren niveles más altos de IL-12. Por ejemplo, en un
55 estudio, las inyecciones intratumorales del plásmido de IL-12 con electroporación se llevan a cabo con 3 inyecciones en los días 1, 5 y 8 y posiblemente un segundo ciclo de tratamiento en la semana 7 (véase, por ejemplo, el ensayo clínico NCT01440816). En otro estudio, los sujetos pueden recibir hasta seis ciclos de tratamiento que consisten en dos días de tratamiento, días 1 y 8, en un ciclo de 28 días. En estos estudios, los pacientes reciben una inyección intratumoral de pIL-12 seguida inmediatamente de una descarga eléctrica alrededor del sitio del tumor que produce la electroporación del ADN plasmídico en las células tumorales (véase, por ejemplo, el documento NCT01579318).
60

La presente invención muestra inesperadamente que niveles muy bajos de expresión de IL-12 localmente en el tumor resultante de la inyección de los vectores lentivíricos descritos en el presente documento fueron terapéuticamente eficaces. En este sentido, el nivel de expresión de IL-12 fue inferior a aproximadamente 0,5
65 microgramos producidos/genomas del vector 1E10 durante las primeras 48 horas, basándose en estudios *in vitro* en condiciones óptimas de cultivo. Los niveles de IL-12 se pueden medir usando un ensayo *in vitro* de transducción tal

como se describe en el Ejemplo 1 y en el Ejemplo 6. Por ejemplo, en el día 0, 1E6 de una célula diana apropiada (tal como células 293-DC-SIGN donde las partículas del vector lentivírico se pseudotipan con una glicoproteína E2 del Sindbis modificada), se colocan en placas de 6 pocillos en 2 ml de medio de cultivo apropiado. El día 1, las células se transducen con genomas de vectores 8.5E9. La transducción generalmente se lleva a cabo en 600 µl de medio, luego se agregan 0,9 ml de medio 6 horas después. El día 3 (48 horas después de la transducción), los sobrenadantes se filtran a través de un filtro de 0,45 µm y se mide la IL-12 usando un ELISA estándar (por ejemplo, usando un kit disponible comercialmente, tal como el kit de I+D M1270).

Por lo tanto, en una realización particular de la presente invención, los vectores víricos descritos en el presente documento que expresan IL-12 se administran por vía intratumoral y, en ciertas realizaciones, se administran por vía intratumoral en una sola inyección, para el tratamiento de un cáncer. En determinadas realizaciones, la inyección intratumoral de los vectores lentivíricos descritos en el presente documento que expresan IL-12 produce un bajo nivel de IL-12. En determinadas realizaciones, se usa una inyección intratumoral única de los vectores lentivíricos descritos en el presente documento que expresan IL-12 y produce un bajo nivel de IL-12. El nivel de IL-12 producido por la inyección intratumoral, en ciertas realizaciones, una sola inyección, de los vectores lentivíricos descritos en el presente documento generalmente varían desde el equivalente de aproximadamente 0,05 microgramos producidos durante las primeras 48 horas hasta aproximadamente 5 microgramos producidos durante las primeras 48 horas, tal como se mide por el ensayo *in vitro* descrito anteriormente. En determinadas realizaciones, el nivel de IL-12 producido por la inyección intratumoral única de los vectores lentivíricos descritos en el presente documento varía desde el equivalente de aproximadamente 0,1 microgramos producidos durante las primeras 48 horas hasta aproximadamente 1 microgramo producido durante las primeras 48 horas. En determinadas realizaciones, El nivel de IL-12 producido por la inyección intratumoral única del vector lentivírico varía de aproximadamente 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 o aproximadamente 5,0 µg de IL-12 producidos durante las primeras 48 horas según lo medido por el ensayo *in vitro* descrito anteriormente. La cantidad de IL-12 producida por una dosis particular de vector lentivírico descrita en el presente documento se puede medir usando estudios *in vitro* en condiciones óptimas de cultivo.

En una realización específica, un vector lentivírico dirigido a CD que expresa IL-12 usado para inyección intratumoral individual es un vector integrante. En otra realización, el vector lentivírico dirigido a CD que expresa IL-12 usado para inyección intratumoral individual es un vector no integrante.

En una realización, un vector lentivírico dirigido a CD que expresa IL-12 se administra por vía intratumoral junto con un agente regulador de agotamiento de linfocitos T, tal como la ciclofosfamida, anti-CTLA4 o un anticuerpo que se une específicamente a un marcador de linfocitos T reguladores (por ejemplo, un anticuerpo anti-CD25; tales anticuerpos incluyen daclizumab). En este sentido, dichos agentes de agotamiento de linfocitos T reguladores se pueden administrar antes, de manera simultánea con, o después de la administración intratumoral de LV-IL12 tal como se describe en el presente documento. En una determinada realización, el vector lentivírico dirigido a CD que expresa IL-12 se administra por vía intratumoral de manera concurrente con la administración sistémica de un agente que agota los linfocitos T reguladores, tal como la ciclofosfamida, anti-CTLA4 o un anticuerpo o agente de agotamiento de linfocitos T reguladores. En determinadas realizaciones, las dosis bajas de ciclofosfamida se administran utilizando un régimen metronómico. En determinadas realizaciones, la ciclofosfamida se administra por vía oral.

Existen o se están evaluando diversos métodos para agotar los linfocitos T reguladores en humanos y los vectores y métodos LV/IL12 descritos en el presente documento se pueden usar con cualquiera de estos métodos. Como apreciaría un experto en la materia, uno de estos métodos es el agotamiento de los linfocitos T reguladores CD44+CD137+ (véase, por ejemplo, Inmunoterapia. mayo de 2012; 4(5): 483-485).

En otra realización, los vectores víricos en el presente documento que expresan IL-12 se administran de manera simultánea con un segundo vector que expresa un antígeno de interés. En un ejemplo adicional, un vector que expresa IL-12 se puede administrar por vía intratumoral de manera concurrente con un vector separado que expresa uno o más antígenos de interés y opcionalmente una o más secuencias adicionales de interés. En una realización adicional, se administra por vía intratumoral un vector que expresa IL-12 y uno o más antígenos de interés. En una realización adicional, se administra por vía intratumoral un vector que expresa IL-12 y un vector separado que expresa uno o más antígenos de interés de manera concurrente en un sitio separado, ya sea por vía intratumoral en un tumor diferente, o en un sitio diferente y a través de una vía diferente (por ejemplo, subcutánea, intradérmica o intramuscular). En otras realizaciones, se puede administrar por vía intratumoral un vector que expresa IL-12 y un vector separado que expresa uno o más antígenos de interés puede administrarse antes o después del vector que expresa IL-12, ya sea en el mismo sitio o en un sitio diferente. En este sentido, los dos vectores se pueden administrar en diferentes sitios y usando diferentes dosis. En ciertas realizaciones en donde un vector que expresa IL-12 y un vector separado que expresa uno o más antígenos y/o que comprenden otras secuencias de interés se administran de manera concurrente, puede ser ventajoso mezclar las composiciones que comprenden los vectores separados en una sola dosis de administración.

Después de una infección vírica, la secuencia de interés (por ejemplo, que codifica la IL-12 y que opcionalmente

codifica uno o más antígenos) es expresada por las células dendríticas diana. Si se ponen en contacto *ex vivo*, las células dendríticas diana se transfieren de nuevo al paciente, por ejemplo por inyección, en donde interactúan con células inmunológicas que son capaces de generar una respuesta inmunitaria contra el antígeno deseado. En algunas realizaciones preferidas, el virus recombinante se inyecta en el paciente donde transduce las células dendríticas diana *in situ*. Las células dendríticas luego expresan IL-12 y, opcionalmente, el antígeno particular asociado con una enfermedad o trastorno a tratar, y el paciente puede generar una respuesta inmunitaria eficaz contra la enfermedad o el trastorno.

El genoma del vector vírico puede contener una secuencia de polinucleótidos que codifica más de un antígeno, y tras la transducción de una célula dendrítica diana, genera respuestas inmunitarias a la multitud de antígenos administrados a la célula. En algunas realizaciones, Los antígenos están relacionados con una sola enfermedad o trastorno. En otras realizaciones, los antígenos están relacionados con múltiples enfermedades o trastornos.

En algunos de los virus, los factores de maduración de CD que activan y/o estimulan la maduración de las CD se administran junto con la secuencia de interés. En alternativas, las CD se activan mediante la administración de factores de maduración de CD antes de, de manera simultánea con, o después de la administración del virus. Los factores de maduración de CD se pueden proporcionar por separado de la administración del virus.

Tal como se describe en el presente documento, una o más moléculas inmunomoduladoras y/o factores de maduración de CD se pueden codificar por una o más secuencias que están contenidas en el genoma vírico y se pueden expresar después de que el virus infecte una célula dendrítica. Las secuencias que codifican moléculas inmunomoduladoras también pueden proporcionarse en un vector separado que se cotransfecta con el vector vírico que codifica la IL-12 y opcionalmente uno o más antígenos en una línea celular de empaquetamiento.

Los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para inmunoterapia adoptiva en un paciente. Un polinucleótido que codifica la IL-12 y en ciertas realizaciones un antígeno deseado se obtienen y se empaquetan en un virus recombinante. Las células dendríticas diana se obtienen del paciente y se transducen con un virus recombinante que contiene un polinucleótido que codifica la IL-12 y opcionalmente el antígeno deseado. Las células dendríticas se transfieren de nuevo al paciente.

Las partículas víricas se pueden inyectar *in vivo*, cuando infectan CD y administran IL-12 y opcionalmente una secuencia que codifica un antígeno u otras moléculas inmunoestimuladoras. La cantidad de partículas víricas es al menos 3×10^6 UI, y puede ser al menos 1×10^7 UI, al menos 3×10^7 UI, al menos 1×10^8 UI, al menos 3×10^8 UI, al menos 1×10^9 UI, o al menos 3×10^9 UI. A intervalos seleccionados, las CD de los órganos linfoides de receptor se pueden usar para medir la expresión, por ejemplo, observando la expresión del marcador, tal como GFP o luciferasa. Las técnicas de monitoreo de ácido nucleico y las mediciones de la actividad de la transcriptasa inversa (RT, por sus siglas en inglés) también se pueden usar para analizar la biodistribución de partículas víricas. Los linfocitos T de las células mononucleares de sangre periférica, los ganglios linfáticos, el bazo o el tejido infectado con patógenos malignos o diana de receptores tratados con partículas de vectores lentivíricos se pueden medir a partir de la magnitud y durabilidad de la respuesta a la estimulación antigénica. Las células de tejidos que no sean CD, tales como células epiteliales y células linfoides, se pueden analizar por la especificidad de administración de genes *in vivo*.

Las vacunas a menudo incluyen un adyuvante. En determinadas realizaciones, los vectores lentivíricos que expresan IL-12 se pueden usar como adyuvantes junto con otras vacunas.

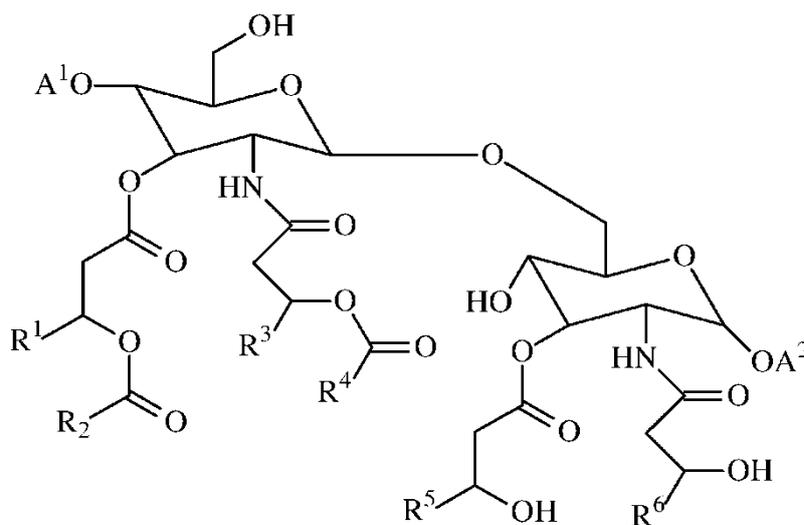
Las partículas del vector lentivírico descritas en el presente documento también se pueden administrar junto con un adyuvante. El adyuvante se puede administrar con las partículas de virus recombinante, antes de las partículas de virus recombinante, o después de las partículas de virus recombinante. Si se administra con las partículas de virus, los adyuvantes deseables no alteran significativamente la integridad de la partícula vírica, como la alteración de la membrana vírica que contiene las glicoproteínas de la envoltura.

Se puede usar varios adyuvantes en combinación con el virus para aumentar aún más la respuesta inmunitaria provocada. Ciertos adyuvantes ilustrativos incluyen alumbre, monofosforil lípido A (MPL) 3 des-O-acilado (véase el documento GB 2220211). QS21 es un glucósido de triterpeno o saponina aislado de la corteza del árbol Quillaja Saponaria Molina que se encuentra en América del Sur (véase Kensil et al., en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell y Newman, Plenum Press, NY, 1995); Pat. de EE.UU. N.º 5.057.540). Otros adyuvantes son las emulsiones de aceite en agua (como el escualeno o el aceite de cacahuete), opcionalmente en combinación con estimulantes inmunitarios, tales como monofosforil lípido A (véase Stoute et al., *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)). Otro adyuvante es CpG (*Bioworld Today*, 15 de noviembre de 1998). Como alternativa, A β se puede acoplar a un adyuvante. Por ejemplo, se puede preparar una versión lipopeptídica de A β acoplado ácido palmítico u otros lípidos directamente al extremo N-terminal de A β tal como se describe para la vacunación contra el antígeno de la hepatitis B (Livingston, *J. Immunol.* 159, 1383-1392 (1997)). Sin embargo, dicho acoplamiento no debería cambiar sustancialmente la conformación de A β de manera que afectase a la naturaleza de la respuesta inmunitaria a la misma. Los adyuvantes se pueden administrar como un componente de una composición terapéutica con un agente activo o pueden administrarse por separado, antes, de manera concurrente o después de

la administración del agente terapéutico.

Una clase de adyuvantes son las sales de aluminio (alumbre), tales como el hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio. Dichos adyuvantes se pueden usar con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos tales como MPL o 3-DMP, QS21, aminoácidos poliméricos o monoméricos tales como ácido poliglutámico o polilisina. Otra clase de adyuvantes son las formulaciones de emulsión de aceite en agua. Dichos adyuvantes se pueden usar con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos, tales como péptidos de muramilo (por ejemplo, N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (tr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2- (1'-2'dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoxipropilamida (DTP-DPP) teramida.TM.) u otros componentes de la pared celular bacteriana. Las emulsiones de aceite en agua incluyen (a) MF59 (WO 90/14837), que contiene escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 % y Span 85 al 0,5 % (que opcionalmente contiene varias cantidades de MTP-PE) formulado en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton Mass.), (b) SAF, que contiene escualeno al 10 %, Tween 80 al 0,4 %, polímero L121 bloqueado con plurónico al 5 % y tr-MDP, ya sea microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado vorticialmente para generar una emulsión de mayor tamaño de partícula, y (c) sistema adyuvante Ribi (RAS), (Ribi Immunochem, Hamilton, Mont.) que contiene escualeno al 2 %, Tween 80 al 0,2 %, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforilípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS), preferentemente MPL+CWS (Detox™). Otra clase de adyuvantes preferidos son los adyuvantes de saponina, tales como Stimulon.TM. (QS21, Aquila, Worcester, Mass.) o partículas generadas allí a partir de ISCOM (complejos inmunoestimulantes) e ISCOMATRIX. Otros adyuvantes incluyen el adyuvante completo de Freund (CFA) y el adyuvante incompleto de Freund (IFA). Otros adyuvantes incluyen citocinas, tales como las interleucinas (IL-1, IL-2 e IL-12), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF).

Otro adyuvante que puede usarse con las composiciones del presente documento se identifica mediante la fórmula química (I):



(I)

en donde los restos A1 y A2 se seleccionan independientemente del grupo de hidrógeno, fosfato y sales de fosfato. El sodio y el potasio son contraiones a modo de ejemplo para las sales de fosfato. Los restos R¹, R², R³, R⁴, R⁵ y R⁶ se seleccionan independientemente del grupo de hidrocarbilo que tiene de 3 a 23 carbonos, representado por C₃-C₂₃. Para mayor claridad, se explicará que cuando un resto se "selecciona independientemente de" un grupo específico que tiene múltiples miembros, debe entenderse que el miembro elegido para el primer resto no afecta de ninguna manera ni limita la elección del miembro seleccionado para el segundo resto. Los átomos de carbono al que R¹, R³, R⁵ y R⁶ están unidos son asimétricos, y por lo tanto pueden existir en la estereoquímica R o S. En una realización, todos esos átomos de carbono están en la estereoquímica R, mientras que en otra realización, todos esos átomos de carbono están en la estereoquímica S.

"Hidrocarbilo" se refiere a un resto químico formado completamente a partir de hidrógeno y carbono, donde la disposición de los átomos de carbono puede ser de cadena lineal o ramificada, no cíclico o cíclico, y el enlace entre átomos de carbono adyacentes puede ser enlaces completamente simples, es decir, para proporcionar un

hidrocarbilo saturado, o puede haber enlaces dobles o triples presentes entre dos átomos de carbono adyacentes, es decir, para proporcionar un hidrocarbilo insaturado, y el número de átomos de carbono en el grupo hidrocarbilo está entre 3 y 24 átomos de carbono. El hidrocarbilo puede ser un alquilo, donde los alquilos representativos de cadena lineal incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo y similares, incluyendo undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, etc.; mientras que los alquilos ramificados incluyen isopropilo, sec-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, isopentilo y similares. Los hidrocarbilos cíclicos saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares; mientras que los hidrocarbilos cíclicos insaturados incluyen ciclopentenilo y ciclohexenilo, y similares. Los hidrocarbilos insaturados contienen al menos un enlace doble o triple entre átomos de carbono adyacentes (denominado "alquenilo" o "alquinilo", respectivamente, si el hidrocarbilo no es cíclico, y cicloalquenilo y cicloalquinilo, respectivamente, si el hidrocarbilo es al menos parcialmente cíclico). Los alquenilos representativos de cadena lineal y ramificada incluyen etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo y similares; mientras que los alquinilos representativos de cadena lineal y ramificada incluyen acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1-butinilo y similares.

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

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

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

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

El adyuvante de fórmula (I) se puede formular en una composición farmacéutica, opcionalmente con un coadyuvante, cada uno como se trata a continuación. En este sentido, se hace referencia a la publicación de patente de los Estados Unidos N.º 2008/0131466 que proporciona formulaciones, por ejemplo, formulación acuosa (AF) y formulaciones de emulsión estable (SE) para adyuvante GLA, cuando estas formulaciones se pueden utilizar para cualquiera de los adyuvantes de fórmula (I).

Se puede administrar un adyuvante con el virus de la invención como una composición única, o se puede administrar antes, simultáneamente con o después de la administración del virus recombinante de la invención. En determinadas realizaciones, se incluye un inmunógeno con el adyuvante. El inmunógeno y el adyuvante se pueden empaquetar y suministrar en el mismo vial o se pueden empaquetar en viales separados y mezclarse antes de su uso. El inmunógeno y el adyuvante se empaquetan normalmente con un marcador que indica la aplicación terapéutica prevista. Si el inmunógeno y el adyuvante se empaquetan por separado, el embalaje generalmente incluye instrucciones para mezclar antes de usar. La elección de un adyuvante y/o vehículo depende de la estabilidad de la vacuna que contiene el adyuvante, la vía de administración, la pauta de dosificación, la eficacia del adyuvante para las especies que se vacunan, y, en seres humanos, un adyuvante farmacéuticamente aceptable es aquel que ha sido aprobado o puede ser aprobado para la administración humana por los organismos reguladores pertinentes. Por ejemplo, El adyuvante completo de Freund no es adecuado para la administración humana. Se prefiere el alumbre, MPL y QS21. Opcionalmente, se pueden usar dos o más adyuvantes diferentes de manera simultánea, tales como el alumbre con MPL, el alumbre con QS21, MPL con QS21, y el alumbre, QS21 y MPL juntos. También, Se puede usar el adyuvante incompleto de Freund (Chang et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 32, 173-186 (1998)), opcionalmente en combinación con cualquiera de alumbre, QS21 y MPL y todas sus combinaciones.

Las composiciones que comprenden los vectores retrovíricos tal como se describen en el presente documento también pueden administrarse simultáneamente con, antes de, o después de la administración de uno o más de otros agentes terapéuticos.

Dicha terapia de combinación puede incluir la administración de una formulación farmacéutica única que contiene un

vector vírico tal como se describe en el presente documento y uno o más agentes activos adicionales, así como la administración de composiciones que comprenden un vector viral de la invención y cada agente activo en su propia formulación de dosificación farmacéutica separada. Por ejemplo, se puede administrar al paciente una composición que comprende un vector vírico y el otro agente activo juntos en una única composición de dosificación entérica (por ejemplo, oral) tal como un comprimido o cápsula, o cada agente administrado en formulaciones de dosificación entérica (por ejemplo, oral). De manera similar, las composiciones que comprenden un vector viral y el otro agente activo pueden administrarse al paciente juntas en una sola composición parenteral (por ejemplo, cualquiera de las vías parenterales conocidas y descritas en el presente documento, tales como composición de dosificación subcutánea, intradérmica, intranodal, intratumoral o intramuscular) como en una solución salina u otra solución fisiológicamente aceptable, o cada agente administrado en formulaciones de dosificación parenteral separadas. Las terapias combinadas que se describen en el presente documento se pueden administrar por la misma vía o pueden administrarse usando diferentes vías. Cuando se usan formulaciones de dosificación separadas, las composiciones que comprenden el vector vírico y uno o más agentes activos adicionales se pueden administrar esencialmente al mismo tiempo, es decir, de manera concurrente, o en instantes escalonados de forma separada, es decir, de manera secuencial y en cualquier orden; se entiende que una terapia de combinación incluye todos estos regímenes.

Por lo tanto, en determinadas realizaciones, también se contempla la administración de composiciones que comprenden un vector vírico de la presente divulgación en combinación con uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, otros agentes anticancerígenos u otra terapia paliativa o adyuvante). En determinadas realizaciones, dichos agentes terapéuticos pueden aceptarse en la técnica como un tratamiento estándar para un cáncer particular tal como se describe en el presente documento. Los ejemplos de agentes terapéuticos contemplados incluyen citocinas, factores de crecimiento, esteroides, AINE, DMARD, antiinflamatorios, inhibidores del punto de control inmunitario, agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos u otros agentes activos y auxiliares.

En una realización, las composiciones que comprenden un vector vírico de la presente invención se administran en combinación con uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer, incluyendo uno o más agentes quimioterapéuticos. Los ejemplos de agentes terapéuticos para el cáncer incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXANTM); alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocuaona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno, tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos como las aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, calicheamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, encitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor del ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuaona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuaona; 2, 2', 2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; trastuzumab, docetaxel, platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); derivados del ácido retinoico como Targretin™ (bexaroteno), Panretin™ (alitretinoína); ONTAK™ (denileucina difitox); esperamicinas; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tales como anti-estrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. Otros agentes terapéuticos contra el cáncer incluyen sorafenib y otros inhibidores de la proteína cinasa, como afatinib, axitinib, bevacizumab, cetuximab, crizotinib, dasatinib, erlotinib, fostamatinib, gefitinib, imatinib, lapatinib, lenvatinib, mubritinib, nilotinib, panitumumab, pazopanib, pegaptanib, ranibizumab, ruxolitinib, trastuzumab, vandetanib, vemurafenib y sunitinib; sirolimus (rapamicina), everolimus y otros inhibidores de mTOR.

En otra realización, las composiciones de vectores víricos de la presente invención se administran en combinación con otro agente inmunoestimulador. Dichos agentes inmunoestimuladores incluyen, pero sin limitación, N-acetilmuramilo-L-alanina-D-isoglutamina (MDP), glucano, IL-12, GM-CSF, anticuerpos interferón- γ y anti-CD40 u otros anticuerpos que se unen y activan las vías coestimuladoras (por ejemplo, CD28, ICOS, OX40, CD27 y similares).

5 En una realización, las composiciones de vectores víricos de la presente invención se administran en combinación con uno o más inhibidores del punto de control inmunitario. Los puntos de control inmunitarios se refieren a varias vías inhibitorias del sistema inmunitario que son cruciales para mantener la autotolerancia y para modular la duración y amplitud de las respuestas inmunitarias. Los tumores usan ciertas vías de punto de control inmunitario como un mecanismo principal de resistencia inmunitaria, particularmente contra los linfocitos T que son específicos para antígenos tumorales. (Véase, por ejemplo, Pardoll, 2012 Nature 12:252; Chen y Mellman 2013 Immunity 39:1). La presente divulgación proporciona inhibidores del punto de control inmunitario que pueden administrarse en combinación con las composiciones de GLA sin antígeno. Dichas terapias combinadas funcionan en conjunto para mejorar una respuesta inmunitaria contra el cáncer. Ciertos virus también han desarrollado mecanismos para cooptar vías de puntos de control inmunitarios. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, dicha terapia combinada se puede usar para mejorar una respuesta inmunitaria antiviral.

Los inhibidores del punto de control inmunitario incluyen cualquier agente que bloquee o inhiba de manera estadísticamente significativa, las vías inhibitorias del sistema inmunitario. Tales inhibidores pueden incluir inhibidores de molécula pequeña o pueden incluir anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen y bloquean o inhiben los receptores del punto de control inmunitario o los anticuerpos que se unen y bloquean o inhiben los ligandos del receptor del punto de control inmunitario. Las moléculas de punto de control inmunitario ilustrativas que se pueden direccionar para el bloqueo o la inhibición incluyen, pero sin limitación, CTLA-4, 4-1BB (CD137), 4-1BBL (CD137L), PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4 (pertenece a la familia de moléculas de CD2 y se expresa en todas las NK, $\gamma\delta$, y linfocitos T CD8 + ($\alpha\beta$) de memoria), CD160 (también denominado BY55) y CGEN-15049. Los inhibidores del punto de control inmunitario incluyen anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, u otras proteínas de unión, que se unen y bloquean o inhiben la actividad de uno o más de CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4, CD160 y CGEN-15049. Los inhibidores del punto de control inmunitario ilustrativos incluyen Tremelimumab (anticuerpo bloqueante CTLA-4), anti-OX40, anticuerpo monoclonal PD-L1 (Anti-B7-H1; MEDI4736), MK-3475 (bloqueante de PD-1), Nivolumab (anticuerpo anti-PD1), CT-011 (anticuerpo anti-PD1), anticuerpo monoclonal BY55, AMP224 (anticuerpo anti-PDL1), BMS-936559 (anticuerpo anti-PDL1), MPLDL3280A (anticuerpo anti-PDL1), MSB0010718C (anticuerpo anti-PDL1) y Yervoy/ipilimumab (inhibidor de punto de control anti-CTLA-4).

En una realización adicional, las composiciones de vectores víricos del presente documento se administran en combinación con otros agonistas de TLR4, o un agonista de TLR8, o un agonista de TLR9. Tal agonista puede seleccionarse de peptidoglucano, polilo:C, CpG, 3M003, flagelina y homólogo de Leishmania de factor de elongación e iniciación ribosómica eucariota 4a (LeIF).

En una realización adicional, las composiciones de vectores víricos de la presente invención se administran en combinación con una citocina. Por "citocina" se entiende un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen hormonas del crecimiento, tal como la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento humana con N-metililo y la hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glucoproteicas, tales como la hormona foliculo estimulante (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora de mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-beta; factor de crecimiento procedente de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como el interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1 a IL-36, incluyendo, pero sin limitación, IL-1, IL-1 alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IL-27, TNF; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando de kit (KL). Tal como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia natural.

En determinadas realizaciones, las composiciones que comprenden vectores víricos tal como se describen en el presente documento pueden administrarse en combinación con cloroquina, un agente lisosomotrópico que previene la acidificación endosómica y que inhibe la autofagia inducida por las células tumorales para sobrevivir al crecimiento celular acelerado y la privación de nutrientes. De forma más general, las composiciones que comprenden vectores víricos tal como se describen en el presente documento se pueden administrar en combinación con agentes terapéuticos que actúan como inhibidores de autofagia, radiosensibilizadores o quimiosensibilizadores, como la

cloroquina, misonidazol, metronidazol y citotoxinas hipóxicas, como la tirapazamina. En este sentido, tales combinaciones de un vector vírico con cloroquina u otro radiosensibilizador o quimiosensibilizador, o inhibidor de autofagia, se puede usar en combinación con otros agentes terapéuticos contra el cáncer o con radioterapia.

5 En otra realización, las composiciones que comprenden vectores víricos tal como se describen en el presente documento se pueden administrar en combinación con fármacos de molécula pequeña que se sabe que dan como resultado la muerte de células tumorales con activación concomitante de respuestas inmunitarias, denominado "muerte celular inmunogénica", tal como la ciclofosfamida, doxorubicina, oxaliplatino y mitoxantrona. Además, las combinaciones con fármacos conocidos por mejorar la inmunogenicidad de las células tumorales como la patupilona
10 (epotilona B), anticuerpo monoclonal dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) 7A7.27, inhibidores de histona desacetilasa (por ejemplo, vorinostat, romidepsina, panobinostat, belinostat y entinostat), el ácido graso n3-poliinsaturado, ácido docosahexaenoico, además inhibidores del proteasoma (por ejemplo, bortezomib), shikonina (el componente principal de la raíz de *Lithospermum erythrorhizon*) y virus oncolíticos, tales como TVec (talimogene laherparepvec). En otras realizaciones, las composiciones que comprenden vectores víricos como se describen en el presente documento se pueden administrar en combinación con terapias epigenéticas, tales como los inhibidores de ADN metiltransferasa (por ejemplo, Decitabina, 5-aza-2'-desoxicidina) que se pueden administrar localmente o sistémicamente.

En otra realización, las composiciones que comprenden un vector vírico tal como se describen en el presente documento se pueden administrar en combinación con uno o más anticuerpos que aumentan la captación de ADCC de tumor por CD. Por lo tanto, la presente invención contempla combinar composiciones que comprenden un vector vírico con cualquier molécula que induzca o mejore la ingestión de una célula tumoral o sus fragmentos por una célula presentadora de antígeno y la posterior presentación de antígenos tumorales al sistema inmunitario. Estas moléculas incluyen agentes que inducen la unión del receptor (como los receptores Fc o manosa) y el transporte a la
25 célula presentadora de antígeno, como los anticuerpos, moléculas similares a anticuerpos, moléculas y polímeros multivalentes multiespecíficos. Dichas moléculas se pueden administrar por vía intratumoral con la composición que comprende el vector vírico, o se pueden administrar por una vía diferente. Por ejemplo, una composición que comprende un vector vírico tal como se describe en el presente documento se puede administrar por vía intratumoral junto con la inyección intratumoral de rituximab, cetuximab, trastuzumab, Campath, panitumumab, ofatumumab, brentuximab, pertuzumab, ado-trastuzumab emtansina, obinutuzumab, anticuerpos anti-HER1, anti-HER2, o anti-HER3 (por ejemplo, MEHD7945A; MM-111; MM-151; MM-121; AMG888), anticuerpos anti-EGFR (por ejemplo, Nimotuzumab, ABT-806) u otros anticuerpos similares. Cualquier armazón multivalente que sea capaz de enganchar a los receptores Fc y otros receptores que puedan inducir la internalización se puede usar en las terapias combinadas descritas en el presente documento, por ejemplo, péptidos y/o proteínas capaces de unirse a dianas que están unidas a fragmentos Fc o polímeros capaces de enganchar a los receptores.

En determinadas realizaciones, la combinación del vector vírico con tales anticuerpos se puede combinar adicionalmente con un anticuerpo que promueve una señal coestimuladora (por ejemplo, bloqueando las vías inhibitorias), tales como anti-CTLA-4, o que activa las vías coestimuladoras como anticuerpos anti-CD40, anti-CD28, anti-ICOS, anti-OX40, anti-CD27 y similares.

Las composiciones que comprenden el vector vírico se pueden administrar solas o en combinación con otros tratamientos contra el cáncer conocidos, tales como la radioterapia, inhibidores del punto de control inmunitario, quimioterapia u otros agentes terapéuticos contra el cáncer, trasplante, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinámica, etc. Las composiciones también se pueden administrar en combinación con antibióticos.

La presente divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer administrando los vectores lentivíricos dirigidos a CD que expresan IL12, opcionalmente en combinación con otros vectores lentivíricos que expresan antígeno, o en combinación con otros agentes terapéuticos. Los ejemplos de cánceres específicos incluyen, pero sin limitación, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de testículo, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal y cáncer de próstata. Los cánceres adicionales son bien conocidos para los expertos en la materia e incluyen, aunque sin limitación: leucemia, linfoma, cáncer de cuello uterino, tumores de glioma, adenocarcinomas, sarcomas, sarcomas de tejidos blandos y cáncer de piel. Los cánceres a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, un tumor de vejiga, tumor de mama, tumor de próstata, carcinoma de células basales, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro y SNC (por ejemplo, tumor de glioma), cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma, cáncer de colon y recto, cáncer de tejido conectivo, cáncer del sistema digestivo; cáncer de endometrio, cáncer de esófago; cáncer de ojo; cáncer de cabeza y cuello; cáncer gástrico; neoplasia intraepitelial; cáncer de riñón; cáncer de laringe; leucemia; cáncer de hígado; cáncer de pulmón (por ejemplo, microcítico y no microcítico); linfoma incluyendo linfoma de Hodgkin y no Hodgkin; melanoma; mieloma, neuroblastoma, cáncer de cavidad oral (por ejemplo, labio, lengua, boca y faringe); cáncer de ovario; cáncer de páncreas, retinoblastoma; rhabdomyosarcoma; cáncer de recto, cáncer renal, cáncer del sistema respiratorio; sarcoma, cáncer de piel; cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de tiroides; cáncer de útero, cáncer del sistema urinario, así como otros carcinomas y sarcomas. El cáncer también incluye neoplasias y trastornos malignos en mamíferos que son bien conocidos en la técnica. En una realización, la presente divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer mediante inyección intratumoral de los vectores lentivíricos dirigidos a CD que expresan IL12, y en algunas realizaciones con una inyección intratumoral única.

Cualquier cáncer con un tumor inyectable se contempla en el presente documento para inyección intratumoral con CD que se dirige a vectores lentivíricos que expresan IL12.

F. Composiciones farmacéuticas y kits

5 También se contemplan en el presente documento composiciones farmacéuticas y kits que contienen un virus proporcionado en el presente documento y uno o más componentes. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir partículas de vectores víricos como se proporcionan en el presente documento y un vehículo farmacéutico. Los kits pueden incluir las composiciones farmacéuticas y/o combinaciones proporcionadas en el presente documento, y uno o más componentes, tales como instrucciones de uso, un dispositivo para administrar un compuesto a un sujeto, y un dispositivo para administrar un compuesto a un sujeto.

15 En el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen partículas víricas como se proporciona en el presente documento y un vehículo farmacéutico adecuado. Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento pueden estar en diversas formas, por ejemplo, en forma sólida, líquida, de polvo, acuosa o liofilizada. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son conocidos en la materia. Dichos vehículos y/o aditivos se pueden formular mediante métodos convencionales y se pueden administrar al sujeto a una dosis adecuada. Los agentes estabilizantes tales como los lípidos, inhibidores de nucleasa, polímeros y los agentes quelantes pueden preservar las composiciones de la degradación dentro del cuerpo.

20 Las partículas del vector vírico proporcionadas en el presente documento se pueden empaquetar como kits. Los kits pueden incluir opcionalmente uno o más componentes, como instrucciones de uso, dispositivos y reactivos adicionales y componentes, tales como tubos, envases y jeringas para la práctica de los métodos. Los kits a modo de ejemplo pueden incluir los virus proporcionados en el presente documento, y opcionalmente pueden incluir instrucciones de uso, un dispositivo para detectar un virus en un sujeto, un dispositivo para administrar el virus a un sujeto y un dispositivo para administrar un compuesto a un sujeto.

30 Los kits que comprenden polinucleótidos que codifican un gen de interés (normalmente un antígeno) también se contemplan en el presente documento. El kit puede incluir al menos un plásmido que codifica componentes de empaquetamiento de virus y un vector que codifica la variante de glicoproteína E2 del virus Sindbis. Algunos kits contendrán al menos un plásmido que codifica componentes de empaquetamiento del virus, un vector que codifica la variante de glicoproteína E2 del virus Sindbis y un vector que codifica al menos un factor de maduración de CD.

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

40 Un kit también puede contener instrucciones. Las instrucciones generalmente incluyen una expresión tangible que describe el virus y, opcionalmente, otros componentes incluidos en el kit y métodos de administración, incluyendo métodos para determinar el estado apropiado del sujeto, la cantidad de dosis adecuada y el método de administración adecuado, para administrar el virus. Las instrucciones también pueden incluir directrices para el seguimiento del sujeto durante la duración del tiempo de tratamiento.

45 Los kits proporcionados en el presente documento también pueden incluir un dispositivo para administrar un virus a un sujeto. Cualquiera de varios dispositivos conocidos en la técnica para administrar medicamentos o vacunas puede incluirse en los kits proporcionados en el presente documento. Los dispositivos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, una aguja hipodérmica, una aguja intravenosa, un catéter, un dispositivo de inyección sin aguja, un inhalador y un dispensador de líquido, tal como un cuentagotas. Normalmente, el dispositivo para administrar un virus del kit será compatible con el virus del kit; por ejemplo, un dispositivo de inyección sin aguja, tal como un dispositivo de inyección de alta presión, puede incluirse en kits con virus que no están dañados por la inyección de alta presión, pero generalmente no se incluye en kits con virus dañados por inyección de alta presión.

55 Los kits proporcionados en el presente documento también pueden incluir un dispositivo para administrar un compuesto, tal como un activador o estimulador de CD, a un sujeto. Cualquiera de los varios dispositivos conocidos en la técnica para administrar medicamentos a un sujeto, puede incluirse en los kits proporcionados en el presente documento. Los dispositivos a modo de ejemplo incluyen una aguja hipodérmica, una aguja intravenosa, un catéter, una inyección sin aguja, pero sin limitación, una aguja hipodérmica, una aguja intravenosa, un catéter, un dispositivo de inyección sin aguja, un inhalador y un dispensador de líquido tal como un cuentagotas. Normalmente, el dispositivo para administrar el compuesto del kit será compatible con el método de administración del compuesto deseado.

65 Los siguientes ejemplos se presentan como ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplos

EJEMPLO 1

INGENIERÍA DE UN VECTOR LENTIVÍRICO QUE EXPRESA IL-12

5 Un vector lentivírico pseudotipado con una glicoproteína E2 de envoltura del Sindbis modificada que dirige el vector lentivírico a las células dendríticas que expresan DC-SIGN (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. N.º, 8.187.872 y 8.323.662) se diseñaron para expresar IL-12 de murino (denominada en el presente documento VP02/IL-12). La IL-12 se compone de 2 disulfuros unidos a subunidades, p35 y p40. Se prepararon dos
10 construcciones diferentes con ambas subunidades conectadas a través de un enlazador de elastina pero en diferentes orientaciones: p35 - elastina - p40 y p40 - elastina - p35 (p35-L-p40; p40-L-p35). Los experimentos iniciales mostraron que el vector p40-L-p35 produjo cantidades mucho mayores de IL-12. En un bioensayo funcional, las células 293 - DC-SIGN se transdujeron con candidatos VP02/IL-12 y se recogieron los sobrenadantes de cultivo. Los esplenocitos de murino se incubaron con los sobrenadantes. En un experimento de transcurso de tiempo de 1 a
15 48 horas, se recogieron sobrenadantes de cultivo de bazo y se analizaron para determinar el IFN γ secretado. Los resultados mostraron que ambos candidatos de VP02/IL-12 producían IL-12 funcional. Sin embargo, el candidato p40-L-p35 se seleccionó para continuar los estudios.

Se llevaron a cabo experimentos adicionales para cuantificar la cantidad de IL-12 producida por los vectores. El experimento fue el siguiente:

- Día 0: Se sembraron células 293T - DCSIGN a 1e6/pocillo en 6 pocillos con 2,5 ml de medio
- Día 1: Al día siguiente, se transfectaron VP02-mIL12 (p35-p40) y VP02-mIL12 (p40-p35): (usando Lipofectamine2000 de Invitrogen). Se incluye el plásmido VP02-GFP para el control positivo de la transfección.
25
 - Se agregó 1,5 ug de plásmido a 250 ul de medio OptiMEM
 - Se agregó 4,5ul de reactivo Lipofectamine2000, se mezcló y se incubó 30 min a TA
 - Se añadió directamente a células sembradas
- Día 1: Transducir vector, 10ul concentrado/pocillo
30
 - VP02-mIL12 (p35-elastina-p40) - no integrante, 3.1e11 genomas/ml
 - VP02-mIL12 (p40-elastina-p35) - no integrante, 5.9e11 genomas/ml
35
 - VP02-GFP - no integrante, 1.9e11 genomas/ml
- Día 2: reemplazar los medios con FBS DMEM reciente al 10 %, incluir un lavado de PBS a 1x
40
- Día 4: recoger sobrenadantes y filtrar a través de 0,45 uM, almacenar en -80 °C hasta ELISA

Se detectó IL-12 en todos los sobrenadantes. La transfección de plásmidos tenía niveles mucho más altos que la transducción de vectores, como cabía esperar. El vector p40 - L - p35 produjo más IL-12 que la orientación inversa. Estos resultados se muestran en la tabla a continuación.
45

	pg/ml	<u>ng/ml</u>	<u>ug/ml</u>
Negativo	BLQ	BLQ	BLQ
Vector GFP	BLQ	BLQ	BLQ
Vector 35-40	4337,6	<u>4,3</u>	0,0
Vector 40-35	161973,3	<u>162,0</u>	0,2
Plásmido GFP	BLQ	BLQ	BLQ
Plásmido 35-40	890050,0	890,1	<u>0,9</u>
Plásmido 40-35	10698666,7	10698,7	<u>10,7</u>
BLQ: por debajo del límite de cuantificación			

EJEMPLO 2

50 VP02/IL-12 COADMINISTRADO CON VECTOR LENTIVÍRICO QUE EXPRESA UN ANTÍGENO TUMORAL MEJORÓ LOS LINFOCITOS T CD8 ESPECÍFICOS DE ANTÍGENO

Este experimento muestra que el suministro conjunto de VP02/IL-12 con VP02 que expresa un antígeno tumoral aumenta la respuesta de los linfocitos T CD8 del antígeno antitumoral.

5 Se llevaron a cabo dos experimentos para evaluar si la presencia de IL-12 generada a partir del vector lentivírico VP02/IL-12 en combinación con la expresión de un antígeno asociado a tumor expresado a partir de un vector lentivírico VP02, puede mejorar las respuestas de linfocitos T CD8 específicas de antígeno en ratones.

10 Se inmunizaron subcutáneamente ratones hembra C57/BL/6 o B6D2/F1 en la base de la cola con VP02/IL-12 y VP02/antígeno tumoral (NY-ESO-1 o CAIX) de acuerdo con la Tabla 1. Las respuestas de los linfocitos T esplénicos se midieron 13 días después de la inmunización mediante tinción intracelular de citocinas después de la reestimulación *ex vivo* con péptidos reactivos de CD8.

TABLA 1			
Componente	[Solución madre]	Dosis final/ratón	Volumen de dosis
VP02/IL-12	5,9E11	1,5E9, 1,5E10	50 µl (s.c.)
VP02/hCAIX	1,4E12	1,5E10	50 µl (s.c.)
VP02/NYESO1	1,2E12	1,5E10	50 µl (s.c.)

15 Tal y como se muestra en la Figura 1 y en la Figura 2, VP02/IL-12 coadministrado con VP02 que expresa NY-ESO-1 (Figura 1) o hCAIX (Figura 2) mejoró las respuestas de los CD8 específicos de antígeno.

20 Se llevaron a cabo experimentos adicionales para evaluar aún más la mejora proporcionada por VP02/IL-12. Como se muestra en la Figura 3, la coadministración de VP02/IL-12 con LV305 (VP02 que expresa NY-ESO-1) mejora las respuestas de linfocitos T CD8 específicas de Ag cuando se administra a dosis relativamente altas del genoma del vector (genomas del vector 1E10). Sin embargo, tenga en cuenta que la expresión general de IL-12 incluso a esta dosis alta de v.g. sigue siendo bastante baja (por ejemplo, ~ menos de 0,5 microgramos producidos durante las primeras 48 horas, basándose en estudios *in vitro* en condiciones óptimas de cultivo). Tenga en cuenta en particular que la respuesta inmunitaria específica de antígeno anti-NY-ESO-1 generada a 1 E9vg en este experimento fue esencialmente no detectable y esta respuesta inmunitaria básicamente indetectable se incrementó inesperadamente significativamente por la administración conjunta de VP02/IL-12 (Figura 3B). VP02/IL-12 coadministrado también mejora las respuestas de CD4 (véase las Figuras 4A y 4B).

30 La coadministración de dosis aún más bajas de VP02/IL-12 (dosis 1E9 vg) con LV305 a una dosis inmunogénica límite (1E9 vg) mejoró las respuestas de CD8 y CD4 (véase la Figura 5A-5D).

EJEMPLO 3

35 LA COADMINISTRACIÓN DE VP02/IL12 MEJORÓ LA ACTIVIDAD TERAPÉUTICA DE LA ALTA DOSIS DE VP02/HCAIX

Este ejemplo describe experimentos realizados para probar los beneficios terapéuticos de VP02/hCAIX con VP02/IL-12 en ratones que han sido expuestos con el clon tumoral que expresa BC.12 hCAIX.

40 Los ratones fueron inyectados por vía subcutánea en su flanco derecho con células tumorales BC.12 que expresaban hCAIX. La terapia se administró el día 8. Los tamaños de los tumores se registraron cada 2-3 días. El protocolo experimental básico se muestra en las Tablas 2 y 3 a continuación.

<u>Tabla 2</u>			
<u>Componente</u>	<u>[Solución madre]</u>	<u>Dosis final/ratón</u>	<u>Volumen de dosis total del artículo de prueba</u>
hCAIX de longitud completa	0,3 mg/ml	5, 0,5 µg	50 µl
VP02/hCAIX	7,1 E11	2,5E10	50 µl
VP02/IL-12	5,9E11	1E10, 1E6	50 µl

45

Tabla 3			
Grupo	ratones n-B6	Dosis del vector hCAIX	Dosis del vector IL-12
1	10	-	-
2	5	-	1,0E10 (s.c.)
3	5	-	1,0E6 (s.c.)
4	10	2,5E10 (s.c.)	-
5	10	5,0E9 (s.c.)	-
6	10	2,5E10 (s.c.)	1,0E10 (s.c.)
7	10	5,0E9 (s.c.)	1,0E10 (s.c.)

Como se muestra en la Figura 6, La coadministración de VP02/IL12 mejoró la actividad terapéutica de dosis altas de VP02/hCAIX, pero la diferencia no fue significativa. De manera similar, la coadministración de VP02/IL-12 mejoró la actividad terapéutica de la dosis media de VP02/hCAIX, sin embargo, la diferencia no fue significativa.

5

EJEMPLO 4

LA COADMINISTRACIÓN DE hVP02/IL12 MEJORÓ LA ACTIVIDAD TERAPÉUTICA DE BAJA DOSIS DE VP02/NY-ESO-1 (LV305)

10

Este experimento muestra que la coadministración de VP02/IL-12 mejoró la actividad terapéutica de una dosis subinmunogénica de VP02 que expresa NY-ESO-1 (LV305).

15

Para este experimento, los métodos fueron: Día 0: Exponer ratones BALB/c con $1,5 \times 10^5$ células CIN.23, i.v. en vena de la cola. Día 3: Inmunizar con VP02/NYESO1 \pm VP02/mL12, en la base de la cola. Día 18: Los linfocitos se aislaron de los tumores y los bazos se analizaron mediante citometría de flujo.

20

Tal como se muestra en la Figura 7A, la eficacia antitumoral mediada por dosis bajas de LV305 se mejoró significativamente al mezclarla con VP02/IL12 y la eficacia antitumoral se correlacionó con la magnitud de los linfocitos T CD8 específicos de NYESO1 (Figura 7B).

25

30

Resumen y conclusiones para los Ejemplos 1-4: VP02/IL12 se puede utilizar para mejorar las respuestas de CD8 y CD4 a la inmunoterapia basada en VP02, incluida la eficacia antitumoral mejorada. El efecto sobre las respuestas de CD8 suele ser equivalente a un aumento de la dosis de LV305 de 3-5 veces, hasta 10 veces más de dosis equivalente para mejorar las respuestas de CD4. VP02/IL12 es normalmente más eficaz cuando la inmunoterapia de VP02 (por ejemplo, LV305) induce niveles de respuesta más débiles. Para LV305, en los modelos de ratón descritos en el presente documento, tales respuestas se inducen normalmente en el intervalo de dosis de $1E9$ - $1E10$ vg. VP02/IL12 tiene menos efecto cuando se usa en dosis bajas. En particular, solo ocasionalmente las dosis inferiores a $1E10$ vg de IL-12 dieron como resultado un efecto potenciador inmunitario para la respuesta de CD8. El VP02/IL12 es normalmente eficaz cuando se usa en dosis iguales (o más altas) que VP02/Ag, sugiriendo que puede expresarse eficazmente desde el mismo vector que el antígeno tumoral contra el cual se desea una respuesta inmunitaria.

EJEMPLO 5

35

ADMINISTRACIÓN DE VP02 QUE EXPRESA OTRAS CITOCINAS

Se analizó una batería de 7 citocinas diferentes expresadas a partir de VP02 para determinar su capacidad para mejorar las respuestas inmunitarias específicas de antígeno específico de tumor.

40

Las citocinas probadas fueron VP02/IL-15, VP02/IL-18, VP02/IL-21, VP02/IL-23, VP02/IL-1 β , VP02/IL-TNF, VP02/IL-IFN γ . Los ratones BALB/c fueron inmunizados dos veces, 3 semanas de diferencia con 3 niveles de dosificación de LV305 (alt., med., baj.) con una dosis constante de VP02/IL-X (alt.). En el día 14, se midieron las respuestas de los linfocitos T en sangre periférica post-cebado (solo dosis media). En el día 33 después del refuerzo, los linfocitos se aislaron de los bazos para su análisis por ICS y citometría de flujo.

45

De las citocinas analizadas, VP02/IL-23 pudo mejorar significativamente las respuestas de linfocitos T CD8 inducidas por LV305 en PBMC después de un cebado (véase la Figura 8).

EJEMPLO 6

50

LA ADMINISTRACIÓN INTRATUMORAL ÚNICA DEL VECTOR LENTIVÍRICO QUE EXPRESA IL-12 DIO COMO RESULTADO UNA EFICACIA ANTITUMORAL SIGNIFICATIVA EN 6 DE 6 MODELOS DE TUMOR MURINO PROBADOS

Este ejemplo muestra que la inyección intratumoral del vector lentivírico que expresa IL-12 fue significativamente eficaz en seis de los seis modelos de tumor de murino probados.

5 La administración intratumoral de LV/IL-12 se probó en 6 modelos diferentes de tumor de murino utilizando los métodos descritos a continuación.

Métodos

10 Día 0: Inocular ratones con células tumorales. Día 7: Inmunizar ratones con LV, pseudotipado con una envoltura del Sindbis modificada, expresando IL-12 (LV703 - versión integrante; 704 - versión deficiente en integración, también denominado VP02) o LV/IL-12 (deficiente en integración) pseudotipado con VSVG en lugar de una envoltura del Sindbis modificada. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron > 100 mm² (almohadilla plantar) o 200 mm² (flanco).

15 Los ratones fueron monitoreados durante más de 6 semanas para el crecimiento tumoral y la supervivencia.

20 Tal y como se muestra en las Figuras 9 - 14, LV/IL-12 fue altamente eficaz para reducir el crecimiento tumoral y aumentar la supervivencia en los animales tratados en los 6 modelos de tumor que se probaron. El vector lentivírico 703/mL-12, un vector lentivírico integrante pseudotipado con una glicoproteína E2 del Sindbis modificada, logró la mejor eficacia antitumoral en todos los modelos tumorales. Si bien no es tan eficaz como el vector 703, los vectores deficientes en integración (704/mL-12 (también conocido como VP02/IL-12) y VSVG/mL-12) también fueron eficaces para retrasar el crecimiento tumoral y aumentar la supervivencia.

25 Se llevaron a cabo experimentos adicionales para determinar los niveles de IL-12 en sobrenadantes obtenidos de células 293-DC-SIGN transducidas con los vectores utilizados en los experimentos de inyección intratumoral descritos anteriormente. Tanto las versiones integrantes como no integrantes del vector se probaron para la producción de IL-12 48 horas después de la transducción en presencia o ausencia de nevirapina. En particular, el día 0, se sembraron en placa 1E6 células 293-DC-SIGN en placas de 6 pocillos en 2 ml de DMEM completo. El día 1, las células se transdujeron con 8,5E9 genomas del vector en ausencia y presencia de nevirapina. La transducción se llevó a cabo en 600 µl de DMEM ± nevirapina completa y luego se añadieron 0,9 ml de DMEM ± nevirapina completa 6 horas más tarde. El día 3 (48 horas después de la transducción), los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm. Se llevó a cabo un ELISA estándar usando un kit de I+D disponible comercialmente (M1270). Los resultados se muestran en la tabla a continuación. El número entre paréntesis muestra la IL-12 medida en presencia de nevirapina.

35

Preparación de vectores	IL-12 ng producida por 1E10 genomas (+ nev)
(704-SinVar1(VP02)-IL-12)- D64V Integrasa	383,7 (20,9)
(703-SinVar1-IL-13)- Integrasa de TS	892,1 (16,5)
(704-VSVG-IL-12)- D64V Integrasa	764,9 (34,3)

40 Aunque no se han llevado a cabo estudios comparativos, la expresión relativamente baja se extendió durante un período de tiempo más largo en comparación con los vectores basados en familias de virus agudos, que expresan niveles más altos de IL-12 durante un período de tiempo más corto, puede contribuir a la sorprendente eficacia observada en los experimentos anteriores y también puede ser ventajoso para el perfil de seguridad. Además, dirigidas específicamente a la expresión de IL12 en células dendríticas, las células mejor conocidas para producir IL-12 fisiológicamente, a diferencia de la inyección aleatoria en cualquier célula tumoral mediante electroporación o mediante otros virus anfotrópicos, podrían contribuir a las respuestas antitumorales inesperadamente eficaces.

45 **EJEMPLO 7**

LA ADMINISTRACIÓN INTRA-TUMORAL ÚNICA DE VECTOR LENTIVÍRICO QUE EXPRESA IL-12 EN COMBINACIÓN CON ANTICUERPO ANTI-CTLA-4 Y/O GLA-AF DIO COMO RESULTADO UNA EFICACIA ANTITUMORAL SIGNIFICATIVA EN 3 DE 3 MODELOS DE TUMOR DE MURINO PROBADOS

50

Este ejemplo muestra que la inyección intratumoral del vector lentivírico que expresa IL-12 en combinación con el anticuerpo anti-CTLA-4 y/o GLA-AF/SE fue significativamente eficaz en tres de los tres modelos de tumor de murino probados.

55 La administración intratumoral de LV/IL-12 en combinación con el anticuerpo anti-CTLA-4 y/o GLA-AF/SE se probó en 3 modelos de tumor de murino diferentes utilizando los métodos descritos a continuación.

Métodos

60 Día 0: Inocular ratones con células tumorales (lado derecho). Día 7: Inocular ratones con células tumorales (lado

izquierdo). Inmunizar ratones con LV703/IL-12 (703 - versión integrante; 1,3E10 genomas; 5,4 ng de rIL12 en preparación por ratón) o LV703/IL-12/RTmut (703 - versión integrante; transcriptasa inversa mutada para eliminar su actividad; 9,8E9 genomas; 5,4 ng de rIL12 en preparación por ratón) con o sin anti-CTLA-4 o GLA. El anti-CTLA-4 se administró una vez por semana hasta el final del estudio. En ratones que recibieron GLA, la primera dosis de GLA (administrada el día 7) fue GLA-AF, mezclado con el vector, y luego se administró por vía intratumoral. Las dosis posteriores de GLA fueron GLA-SE, administrado una vez por semana hasta el final del estudio. Los ratones se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron > 100 mm² (almohadilla plantar) o 200 mm² (flanco).

Los ratones fueron monitoreados durante más de 6 semanas para el crecimiento tumoral y la supervivencia.

Tal como se muestra en las Figuras 17-19, 703/IL-12 solo fue altamente eficaz para reducir el crecimiento tumoral y aumentar la supervivencia en los animales tratados en los 3 modelos tumorales que se probaron, confirmando los resultados mostrados en el EJEMPLO 6. Este beneficio terapéutico fue impulsado por la presencia de partículas de vector con transcriptasa inversa intacta, ya que el crecimiento tumoral en ratones tratados con LV703/IL-12/RTmut fue similar al de los ratones con tumor no tratados. Las observaciones adicionales en cada uno de los modelos de tumor probados se detallan a continuación.

En el modelo de almohadilla de pie B16 (Fig. 17), la administración intratumoral de LV703/IL-12 en el tumor primario (lado derecho) retrasó significativamente el crecimiento del tumor en el sitio distal no tratado (lado izquierdo), un fenómeno conocido como el efecto abscopal. La adición del anticuerpo anti-CTLA-4 retrasó aún más el crecimiento del tumor primario pero no del tumor distal.

En el modelo de flanco B16 (Fig. 18), la administración intratumoral de LV703/IL-12 en el tumor primario retrasó significativamente el crecimiento del tumor en el sitio distal no tratado. La adición del anticuerpo anti-CTLA-4 no retrasó aún más el crecimiento del tumor primario (presumiblemente porque LV703/IL-12 solo tuvo éxito en la supresión de casi todo el crecimiento tumoral) pero sí retrasó aún más el crecimiento del tumor distal (véase la Fig. 18B). En este modelo, una sola inyección intratumoral de LV703/IL-12 condujo a la regresión de tumores primarios y retrasó el crecimiento de tumores secundarios no tratados. Los ratones con tumores en regresión no pudieron rechazar una segunda exposición tumoral, lo que sugiere una generación subóptima de memoria inmunológica.

En el modelo de tumor de mama 4T1 (Fig. 19), como se señaló anteriormente, la administración intratumoral de LV703/IL-12 en el tumor primario retrasó significativamente el crecimiento del tumor primario. La administración intratumoral adicional de GLA-SE retrasó aún más el crecimiento del tumor primario (Figura 19A). La administración intratumoral de LV703/IL-12 + GLA-SE en el tumor primario también provocó un retraso en el crecimiento del tumor en el sitio distal no tratado (Figura 19C). La adición del anticuerpo anti-CTLA-4 a LV703/IL-12 + GLA-SE no retrasó aún más el crecimiento del tumor primario o distal (presumiblemente porque 4T1 es un modelo de tumor agresivamente invasivo, con animales que mueren por asfixia debido a la diseminación tumoral a los pulmones; véase Figura 19B y 19C;). La supervivencia de los animales se tabula en la Tabla 4.

Tabla 4			
Datos provisionales de supervivencia	Día 29	Día 33	Día 36
Sin tratamiento	0/10	0/10	0/10
GLA-AF/SE solo	0/10	0/10	0/10
LV703/IL12	10/10	10/10	5/10
LV703/IL12+GLA-AF/SE	20/20	19/20	19/20
LV703/IL12+GLA-AF/SE+aCTLA4 Ab	10/10	10/10	10/10

Por lo tanto, los ejemplos anteriores apoyan el uso de LV/IL-12 solo o en combinación con inhibidores de punto de control y/o de agonistas de TLR4 para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades que se benefician de la inmunoterapia.

EJEMPLO 8

VP02/IL-12 AUMENTA SIGNIFICATIVAMENTE RESPUESTAS DE LINFOCITOS T CD4 ESPECÍFICAS ANTIGENO CUANDO SE COADMINISTRÓ CON PROTEÍNA RECOMBINANTE Y GLA/SE

Los experimentos en este Ejemplo se realizaron para evaluar la inmunogenicidad de la coadministración conjunta de VP02/IL-12 con proteína recombinante + GLA/SE, un adyuvante agonista de TLR4 de lípido A sintético.

Se inmunizaron ratones hembra B6D2/F1 con VP02/IL-12 y NY-ESO-1 recombinante (rNY-ESO-1), con o sin GLA/SE, s.c. inyectado en la base de la cola (véase la Tabla 5). Las respuestas de los linfocitos T esplénicas se midieron 7 días después de la inmunización por ICS después de la reestimulación *ex vivo* con péptidos reactivos CD4 y CD8.

Tabla 5				
Grupo	n=	Genomas de VP02 /IL-12	Tratamiento con rNY-ESO-1:	GLA/SE
1	5	-	-	-
2	5	-	5 mg	-
3	5	1,5E10	-	-
4	5	1,5E9	5 mg	-
5	5	1,5E8	5 mg	-
6	5	1,5E7	5 mg	-
7	5	1,5E6	5 mg	-
8	5	-	5 mg	+
9	5	1,5E9	5 mg	+
10	5	1,5E8	5 mg	+
11	5	1,5E7	5 mg	+
12	5	1,5E6	5 mg	+

Los resultados se muestran en la Figura 15. Como cabía esperar, la proteína recombinante con GLA-SE indujo una respuesta de linfocitos T TH1 CD4. La Figura 15A muestra el porcentaje de linfocitos T CD4 positivos para citocinas y la Figura 15B muestra el porcentaje total de linfocitos T IFN γ CD4 positivos. Los resultados muestran que la adición de VP02/IL-12 aumentó significativamente las respuestas de linfocitos T CD4 específicas de Ag de NY-ESO-1 cuando se coadministraron con rNY-ESO-1 + GLA-SE mezclado y administrado s.c. en la base de la cola.

En un experimento separado que usa antígeno de superficie de hepatitis B recombinante (rHBsAg) en combinación con GLA-SE, la adición de VP02/IL-12 aumentó significativamente las respuestas de los linfocitos T CD8 (Figura 16A y 16B) pero disminuyó las respuestas de los linfocitos T CD4 (Figura 16C y 16D).

La disminución, o al menos la falta de aumento, en CD4, los niveles de respuesta se destacan en comparación con el efecto observado para la mejora de las respuestas de VP02/IL12 contra los antígenos que expresan VP02. Una posible explicación es que el VP02 que expresa el antígeno no induce altas respuestas de CD4 solo, mientras que GLA con antígeno de proteína recombinante induce niveles significativos de CD4. Por lo tanto, La adición de IL12 puede no proporcionar estimulación adicional para la inducción de CD4.

EJEMPLO 9

IL-12 E IFN γ DETECTADOS EN LA SANGRE DE RATONES TRATADOS CON LV/IL-12 INTRATUMORAL

Los experimentos en este ejemplo se realizaron para evaluar los niveles plasmáticos y la cinética de IL-12 e IFN γ después de la inyección intratumoral de LV/IL-12.

Los ratones (6 hembras/grupo) fueron inoculados con 1×10^5 células tumorales B16. Cuando los tumores se hicieron palpables (Día 7), los ratones fueron inmunizados con LV703/mL12, IT. En los días 0 (pre-sangrado), 1, 3, 6, 8, 12, 15, 17 y 20, se extrajo sangre para medir la cantidad de IL-12 e IFN γ presente en el plasma. El crecimiento tumoral se controló 2-3 veces por semana. Los ratones fueron sacrificados cuando el área del tumor excedió los 200 mm² (flanco). Como se muestra en la Figura 20, se detectó un aumento de IL12 e IFN γ en la sangre de ratones inyectados con LV703/mL12 por vía intratumoral.

EJEMPLO 10

ESTUDIOS DE AGOTAMIENTO CELULAR EN RATONES TRATADOS CON LV/IL-12 INTRATUMORAL

Los experimentos en este ejemplo se llevaron a cabo para investigar qué células eran responsables del efecto antitumoral en ratones tratados con LV/IL-12 intratumoral.

Métodos

Los ratones (10-20 hembras/grupo) fueron inoculados con 1×10^5 células tumorales B16. El agotamiento de subconjuntos de células inmunitarias específicas con anticuerpos (200 ug) comenzó el día 4 y continuó dos veces por semana. Cuando los tumores se hicieron palpables (Día 7), los ratones fueron inmunizados con LV703/mL12, IT. El crecimiento tumoral se controló 2-3 veces por semana. Los ratones fueron sacrificados cuando el área del tumor excedió los 200 mm² (flanco).

Tal como se muestra en la Figura 21 y confirmando experimentos anteriores, una sola inyección intratumoral de

LV703/IL12 condujo a la regresión de los tumores. El agotamiento de los subconjuntos de células inmunitarias individuales no anuló la eficacia antitumoral inducida por LV/IL12 i.t. Véase en particular las Figuras 21A y 21B. Además, el agotamiento de las células CD4 y NK juntas tampoco anuló la eficacia antitumoral inducida por LV/IL-12 i.t. El agotamiento de los linfocitos T CD8 mostró que estas células son necesarias, pero no suficientes, para mediar el control antitumoral en ratones inyectados con LV703/IL-12 i.t. (Véase, por ejemplo, la Figura 21, donde el agotamiento de solo las células CD8 no anuló el efecto antitumoral, pero cuando se combinó con el agotamiento de las células CD4, células NK o ambas, el control del tumor fue anulado).

En el día 98 de este experimento del total de 41 ratones restantes, ocho ratones tenían un tumor; 33 ratones no tenían tumor, confirmando aún más la inesperada eficacia del tratamiento intratumoral con LV/IL12.

De manera interesante, Se observó vitiligo severo en ratones inyectados con LV/IL12 intratumoral y sin linfocitos T CD4 (véanse las Figuras 21B y 21E). Este efecto solo se observó cuando los linfocitos T CD8 estaban presentes, lo que sugiere que LV703/IL-12 i.t. generó al menos un subconjunto de linfocitos T CD8 efectores que se dirigieron a los melanocitos, lo que conduce a la despigmentación del color del pelaje (vitiligo). El vitiligo es un inicio comúnmente observado de enfermedad autoinmune como resultado de una fuerte inducción de la eficacia antitumoral específica del melanoma. Además, ya que el vitiligo se observó solo en ratones tratados con LV703/IL-12 i.t. sin linfocitos T CD4, la eliminación de los linfocitos T reguladores puede mejorar aún más la terapia con LV703/IL-12 i.t.

En resumen, la administración local (intratumoral) de LV/mL12 promueve la respuesta sistémica antitumoral mediada por linfocitos T CD8 (hace que un tumor frío se caliente). Sin quedar ligados a ninguna teoría, es posible que para un desarrollo óptimo de la memoria inmunológica, los linfocitos T reguladores pueden necesitar agotarse.

EJEMPLO 11

ESTUDIOS DE AGOTAMIENTO DE LINFOCITOS T REGULADORES EN RATONES TRATADOS CON LV/IL-12 INTRATUMORAL

Se realizan experimentos para investigar la eficacia terapéutica de la combinación del agotamiento de los linfocitos T reguladores y la administración intratumoral de IL-12.

Métodos

Los ratones (10-20 hembras/grupo) se inoculan con 1×10^5 células tumorales B16. El agotamiento de los linfocitos T reguladores con dosis bajas de ciclofosfamida, los anticuerpos anti-CD25 o anti-CTLA4 (200 ug), o la toxina diftérica (véase más abajo) se inicia el día 4 y continúa dos veces por semana. Cuando los tumores se hicieron palpables (Día 7), los ratones se inmunizaron con LV703/mL12, por vía intratumoral. El crecimiento tumoral se controla 2-3 veces por semana. Los ratones se sacrificaron cuando el área del tumor excede los 200 mm² (flanco).

Los linfocitos T reguladores también se agotan usando ratones transgénicos (por ejemplo, ratones DREG o Foxp3.LuciDTR). Estos ratones pueden transportar un transgen del receptor de toxina diftérica (DTR) bajo el control de un promotor Foxp3, permitiendo así el agotamiento específico de los linfocitos T reguladores mediante la administración de la toxina de la difteria en cualquier momento (véase, por ejemplo, Li et al., Eur J Immunol 2010, 40:3325-3335).

Sin quedar ligados a ninguna teoría, el agotamiento de los linfocitos T reguladores mejora aún más la terapia con LV703/IL-12 i.t. Se pueden medir las células de memoria para determinar el aumento en las células de fenotipo de memoria en comparación con los grupos que no reciben terapia de agotamiento de linfocitos T reguladores. Se realizan experimentos adicionales para volver a exponer a los ratones cuyos tumores regresan para determinar si la terapia es suficiente para anular el crecimiento tumoral después de la reexposición.

Las secuencias desveladas en el listado de secuencias también se proporcionan en el documento WO2011011584:

SEQ ID NO	DESCRIPCIÓN
1	glicoproteína E2 del virus Sindbis
2	SVGmu
3	Variante de E2
4	Variante de E2
5	Variante de E2
6	Variante de E2
7	Variante de E2
8	Variante de E2

(continuación)

9	Variante de E2
10	Variante de E2
11	Variante de E2
12	Variante de E2
13	Variante de E2
14	Variante de E2
15	Variante de E2
16	Variante de E2
17	Secuencia a modo de ejemplo de glicoproteínas de envoltura del virus Sindbis, cepa HR
18	Proteína E2 de la cepa HR
19	Proteína del Sindbis
20	Secuencia de poliproteínas E3/E2
21	Región del vector U3
22	Región del vector U3
23	Región del vector U3
24	Péptido OVA257
25	Péptido AH1A5
26	RSKRS de fusión E2/E3
27	RSKR de fusión E2/E3
28	marcador de epítipo FLAG

5 Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "y" y "el" o "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un antígeno" incluye una pluralidad de tales antígenos, y la referencia a "una célula" o "la célula" incluye la referencia a una o más células y equivalentes de las mismas (por ejemplo, pluralidad de células) conocidas por los expertos en la materia, etcétera. De manera similar, la referencia a "un compuesto" o "una composición" incluye una pluralidad de tales compuestos o composiciones, y se refiere a uno o más compuestos o composiciones, respectivamente, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Cuando se describen o 10 reivindicán etapas de un método, y se describe que las etapas ocurren en un orden particular, la descripción de una primera etapa que ocurre (o se realiza) "antes de" (es decir, antes) una segunda etapa tiene el mismo significado si se reescribe para indicar que la segunda etapa ocurre (o se realiza) "posterior" a la primera etapa. El término "aproximadamente" cuando se refiere a un número o a un intervalo numérico significa que el número o intervalo numérico mencionado es una aproximación dentro de la variabilidad experimental (o dentro del error experimental estadístico), y por lo tanto el número o intervalo numérico puede variar entre el 1% y el 15% del número o intervalo numérico indicado. La expresión "comprendiendo" (y términos relacionados tales como "comprender" o "que comprende" o "que tiene" o "que incluye") no pretende excluir que en otras ciertas realizaciones, por ejemplo, una realización de cualquier composición de materia, composición, método o proceso, o similar, descrito en el presente documento, puede "consistir en" o "consistir esencialmente en" las características descritas.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Immune Design Corporation

25 <120> COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN VECTORES LENTIVÍRICOS QUE EXPRESAN IL-12 Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

<130> 31943/50189A/PC

30 <160> 28

<170> PatentIn versión 3.5

35 <210> 1
<211> 423
<212> PRT
<213> virus Sindbis

ES 2 785 503 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (160)..(160)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

5

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val His Gly Lys Lys Ile Pro Cys Thr Val Tyr Asp Arg Leu Lys Xaa

ES 2 785 503 T3

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

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
 420

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

<400> 2

5

10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

Gly Asp Tyr Lys Thr Gly Thr Val Ser Thr Arg Thr Glu Ile Thr Gly
 275 280 285

Cys Thr Ala Ile Lys Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys
 290 295 300

Trp Val Phe Asn Ser Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala
 305 310 315 320

Gln Gly Lys Leu His Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met
 325 330 335

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

Ser Leu Gln Leu Asp Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg
 355 360 365

Leu Gly Ala Asn Pro Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr
 370 375 380

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

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

Pro His Gly Trp Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His
 420 425 430

Pro Val Tyr Thr Ile Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met
 435 440 445

ES 2 785 503 T3

Ile Gly Val Thr Val Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu
450 455 460

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

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

Glu Thr Met Ser Tyr Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val
500 505 510

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

Ser Cys Cys Leu Pro Phe Leu Val Val Ala Gly Ala Tyr Leu Ala Lys
530 535 540

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

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

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

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

Cys Cys Gly Ser Leu Glu Cys Gln Pro Ala Ala His Ala Gly Tyr Thr
610 615 620

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

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

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

Thr Ala Ala Met Lys Val Gly Leu Arg Ile Val Tyr Gly Asn Thr Thr
675 680 685

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

ES 2 785 503 T3

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

ES 2 785 503 T3

945 950 955 960

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

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

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

5

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ile Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Ser Cys Thr Leu Ala

10

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
 980

<210> 4
 <211> 982
 <212> PRT
 <213> virus Sindbis

5

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr

ES 2 785 503 T3

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

ES 2 785 503 T3

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
 980

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

5

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 785 503 T3

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

ES 2 785 503 T3

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

Ser Thr Arg Arg
980

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

5

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

900 905 910
Gly Lys Lys Thr Thr Cys Asn Ala Glu Cys Lys Pro Pro Ala Asp His
915 920 925
Ile Val Ser Thr Pro His Lys Asn Asp Gln Glu Phe Gln Ala Ala Ile
930 935 940
Ser Lys Thr Ser Trp Ser Trp Leu Phe Ala Leu Phe Gly Gly Ala Ser
945 950 955 960
Ser Leu Leu Ile Ile Gly Leu Met Ile Phe Ala Cys Ser Met Met Leu
965 970 975
Thr Ser Thr Arg Arg
980

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

<400> 7

5

Met Ser Ala Ala Pro Leu Val Thr Ala Met Cys Leu Leu Gly Asn Val
1 5 10 15
Ser Phe Pro Cys Asp Arg Pro Pro Thr Cys Tyr Thr Arg Glu Pro Ser
20 25 30
Arg Ala Leu Asp Ile Leu Glu Glu Asn Val Asn His Glu Ala Tyr Asp
35 40 45
Thr Leu Leu Asn Ala Ile Leu Arg Cys Gly Ser Ser Gly Arg Ser Lys
50 55 60
Arg Ser Val Ile Asp Asp Phe Thr Leu Thr Ser Pro Tyr Leu Gly Thr
65 70 75 80
Cys Ser Tyr Cys His His Thr Val Pro Cys Phe Ser Pro Val Lys Ile
85 90 95
Glu Gln Val Trp Asp Glu Ala Asp Asp Asn Thr Ile Arg Ile Gln Thr
100 105
Ser Ala Gln Phe Gly Tyr Asp Gln Ser Gly Ala Ala Ser Ala Asn Lys
115 120 125
Tyr Arg Tyr Met Ser Leu Lys Gln Asp His Thr Val Lys Glu Gly Thr

10

ES 2 785 503 T3

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
 980

<210> 8
 <211> 981
 <212> PRT
 <213> virus Sindbis

5

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 785 503 T3

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Thr Arg Arg
980

<210> 9
<211> 982
5 <212> PRT
<213> virus Sindbis

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
980

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

5

<400> 10

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Tyr Ser Ala Asp Phe Gly Gly Met Ala Thr Leu Gln Tyr Val Ser

ES 2 785 503 T3

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
 980

<210> 12
 <211> 981
 <212> PRT
 <213> virus Sindbis

5

<400> 12

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

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

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

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

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

10

ES 2 785 503 T3

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Thr Arg Arg
 980

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

5

<400> 13

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

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

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

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

10

ES 2 785 503 T3

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

ES 2 785 503 T3

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

ES 2 785 503 T3

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
 980

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

5

<400> 14

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

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

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

10

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

805 810 815

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Thr Arg Arg
980

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

5

<400> 15

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

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

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

10

ES 2 785 503 T3

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

ES 2 785 503 T3

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

ES 2 785 503 T3

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
 980

<210> 16
 <211> 981
 <212> PRT
 <213> virus Sindbis

5

<400> 16

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

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

10

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

275	280	285													
Gln Cys Val Ala Tyr Lys Ser Asp Gln Thr Lys Trp Val Phe Asn Ser															
290	295	300													
Pro Asp Leu Ile Arg His Asp Asp His Thr Ala Gln Gly Lys Leu His															
305	310	315													
Leu Pro Phe Lys Leu Ile Pro Ser Thr Cys Met Val Pro Val Ala His															
	325	330													
Ala Pro Asn Val Ile His Gly Phe Lys His Ile Ser Leu Gln Leu Asp															
	340	345													
Thr Asp His Leu Thr Leu Leu Thr Thr Arg Arg Leu Gly Ala Asn Pro															
	355	360													
Glu Pro Thr Thr Glu Trp Ile Val Gly Lys Thr Val Arg Asn Phe Thr															
	370	375													
Val Asp Arg Asp Gly Leu Glu Tyr Ile Trp Gly Asn His Glu Pro Val															
385	390	395													
Arg Val Tyr Ala Gln Glu Ser Ala Pro Gly Asp Pro His Gly Trp Pro															
	405	410													
His Glu Ile Val Gln His Tyr Tyr His Arg His Pro Val Tyr Thr Ile															
	420	425													
Leu Ala Val Ala Ser Ala Thr Val Ala Met Met Ile Gly Val Thr Val															
	435	440													
Ala Val Leu Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr															
	450	455													
Ala Leu Ala Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys															
465	470	475													
Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala Glu Thr Phe Thr Glu Thr Met Ser Tyr															
	485	490													
Leu Trp Ser Asn Ser Gln Pro Phe Phe Trp Val Gln Leu Cys Ile Pro															
	500	505													
Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu Pro															
	515	520													
		525													

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Ser Thr Arg Arg
980

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

<400> 17

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Leu Ala Ala Phe Ile Val Leu Met Arg Cys Cys Ser Cys Cys Leu

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Ser Thr Arg Arg
 980

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

5

<400> 18

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
 420

<210> 19
 <211> 65
 5 <212> PRT
 <213> virus Sindbis
 <400> 19

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

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

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

10

ES 2 785 503 T3

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

Arg
 65

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

5

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 785 503 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 785 503 T3

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

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

Cys Cys Val Arg Ser Ala Asn Ala
 485

5 <210> 21
 <211> 683
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 21

cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60
 ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120
 aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaaag aaaagggggg 180
 actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatctc cttgatctgt ggatctacca 240
 cacacaaggc tacttccttg attggcagaa ctacacacca gggccaggga tcagatatcc 300
 actgaccttt ggatggtgct acaagctagt accagttgag caagagaagg tagaagaagc 360
 caatgaagga gagaacaccc gcttgttaca ccctgtgagc ctgcatggga tggatgacct 420
 ggagagagaa gtattagagt ggaggtttga cagccgccta gcatttcac acatggcccc 480
 agagctgcat ccggactgta ctgggtctct ctggttagac cagatctgag cctgggagct 540
 ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa gcctcaataa agcttgacct gagtgcttca 600
 agtagtgtgt gcccgctctgt tgtgtgactc tggtaactag agatccctca gaccctttta 660
 10 gtcagtgtgg aaaatctcta gca 683

<210> 22
 <211> 416
 <212> ADN
 15 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

<400> 22

cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60
 ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120
 aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaaag aaaagggggg 180
 actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatctg ctttttgacct gtactgggtc 240
 tctctgggta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactagggga acccactgct 300
 taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgtc tcaagtagtg tgtgccccgc tgttgtgtga 360
 20 ctctggtaac tagagatccc tcagacctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagca 416

ES 2 785 503 T3

<210> 23
 <211> 401
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
 5 <400> 23
 cctagaaaaa catggagcaa tcacaagtag caatacagca gctaccaatg ctgattgtgc 60
 ctggctagaa gcacaagagg aggaggaggt gggttttcca gtcacacctc aggtaccttt 120
 aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttactgg aagggctaata 180
 tcactcccaa cgaagacaag atctgctttt tgccctgtact gggctctctct ggtagacca 240
 gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaacca ctgcttaagc ctcaataaag 300
 cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag 360
 atccctcaga cccttttagt cagtgtggaa aatctctagc a 401
 10 <210> 24
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus
 15 <400> 24
 Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
 1 5
 20 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <400> 25
 Ser Pro Ser Tyr Ala Tyr His Gln Phe
 1 5
 30 <210> 26
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> virus Sindbis
 <400> 26
 Arg Ser Lys Arg Ser
 1 5
 35 <210> 27
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> virus Sindbis
 <400> 27
 Arg Ser Lys Arg
 1
 45 <210> 28
 <211> 8
 <212> PRT

ES 2 785 503 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<400> 28

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una partícula de vector lentivírico dirigida a células dendríticas en la que la partícula comprende un genoma de vector lentivírico que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica IL-12, para su uso en el tratamiento del cáncer, administrándose la composición por vía intratumoral.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la partícula del vector lentivírico comprende una glicoproteína E2 de alfavirus modificado que se une selectivamente a células dendríticas que expresan DC-SIGN.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la partícula del vector lentivírico comprende una envoltura que comprende una glicoproteína E2 del virus Sindbis de la SEQ ID NO: 1 en la que 160X está ausente o es un aminoácido distinto del ácido glutámico, o una variante de la SEQ ID NO: 1 del mismo que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 y en la que 160X está ausente o es un aminoácido distinto del ácido glutámico, capaz de infectar células dendríticas; en donde E2 no es parte de una proteína de fusión con la E3 del virus Sindbis.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tratamiento comprende además administrar un adyuvante por vía intratumoral.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el adyuvante es una formulación de emulsión acuosa o de aceite en agua de glucopiranosil lípido A (GLA).
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tratamiento comprende además el agotamiento de linfocitos T reguladores.
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el agotamiento de los linfocitos T reguladores comprende la administración sistémica de ciclofosfamida o de un anticuerpo anti-CD25.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la administración sistémica de ciclofosfamida o de un anticuerpo anti-CD25 es anterior a la inyección intratumoral de la composición que comprende el vector lentivírico.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tratamiento comprende además administrar una segunda partícula de vector lentivírico que codifica un antígeno tumoral.
10. Un producto que comprende: (a) una primera composición, una partícula de vector lentivírico dirigida a células dendríticas que comprende un genoma de vector lentivírico que comprende una secuencia que codifica la IL-12; y (b) una segunda composición que comprende una segunda partícula del vector lentivírico que codifica un antígeno tumoral; para su uso en un método de tratamiento de cáncer en un sujeto en donde la primera composición se administra por vía intratumoral y la segunda composición se administra por una vía diferente.
11. El producto para el uso de la reivindicación 10 en el que la segunda composición se administra por vía intradérmica, subcutánea o intramuscular.
12. El producto para el uso de la reivindicación 10 en el que la primera composición y la segunda composición se administran de manera simultánea o secuencial.
13. Una partícula de vector lentivírico que comprende:
- una envoltura que comprende una glicoproteína E2 del virus Sindbis de la SEQ ID NO: 1 en la que 160X está ausente o es un aminoácido distinto del ácido glutámico, o una variante de la SEQ ID NO: 1 que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 y en la que 160X está ausente o es un aminoácido distinto del ácido glutámico, capaz de infectar células dendríticas; en donde E2 no es parte de una proteína de fusión con el virus Sindbis E3; y
 - un genoma del vector lentivírico que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la IL-12.
14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la partícula del vector lentivírico de la reivindicación 13 en donde la IL-12 es una IL-12 de cadena sencilla (scIL-12).
15. La composición para el uso o la partícula de vector lentivírico de la reivindicación 14 en donde el scIL-12 comprende p35-L-p40 o p40-L-p35.
16. La partícula del vector lentivírico de la reivindicación 13, en la que el genoma del vector lentivírico comprende además una secuencia que codifica un antígeno, opcionalmente en donde el antígeno es un antígeno asociado a tumor, un antígeno vírico, un antígeno bacteriano o un antígeno fúngico.

17. La partícula del vector lentivírico de la reivindicación 16 en la que el antígeno asociado a tumor se selecciona del grupo que consiste en fosfatasa ácida prostática, antígeno específico de la próstata, NKX3.1, antígeno de membrana específico de la próstata, PRAME; BAGE; RAGE, NY-ESO-1, SAGE, HAGE, GAGE, Plu-1, HASH -1, HasH-2, Cripto, Criptin, MART-1/Melan-A, gp100, gp75, mda-7, tirosinasa, proteína relacionada con tirosinasa, p53, Ras, c-Myc, A-Raf, B-Raf y C-Raf, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, GAGE-2, GAGE -8, GAGE-3, GAGE -4, GAGE -5, GAGE -6, GAGE -7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSM, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, ICE, MUC1, MUC2, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, antígeno tumoral de Wilms (WT1), AFP, β -catenina/m, Caspasa-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina/m, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, Anexina II, CDC27/m, TPI/mbcr-abl, BCR-ABL, factor regulador de interferón 4 (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR, transductor de señal de calcio asociado a tumor 1 (TACSTD1) TACSTD2, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR y EGFRvIII), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR), cinasa unida a integrina (ILK), STAT3, STAT5, STAT6, HIF-1, HIF-2, factor nuclear-Kappa B (NF- κ B), Notch1-4, c-Met, dianas en mamíferos de la rapamicina (mTOR), WNT, PMSA, PR-3, MDM2, mesotelina, carcinoma de células renales - 5T4, SM22-alfa, anhidrasas carbónicas I (CAI) y IX (CAIX) (también conocida como G250), STEAD, TEL/AML1, GD2, proteinase3, hTERT, puntos de corte de translocación de sarcoma, EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (gen de fusión TMPRSS2 ETS), NA17, PAX3, ALK, receptor de andrógenos, ciclina B1, ácido polisialílico, MYCN, RhoC, GD3, fucosil GM1, mesotelio, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, proteína de esperma 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, legumain, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2 y antígeno relacionado con fos 1.
18. Una composición que comprende la partícula del vector lentivírico de la reivindicación 13 para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición.
19. La composición para el uso de la reivindicación 18, que comprende además administrar al sujeto una cantidad eficaz de una composición que comprende un segundo vector lentivírico que codifica un antígeno tumoral.
20. La composición para el uso de la reivindicación 19 en la que (i) la partícula del vector lentivírico de la reivindicación 13 y el segundo vector lentivírico se administran simultáneamente, o (ii) en la que la partícula del vector lentivírico de la reivindicación 13 y el segundo vector lentivírico se administran secuencialmente en diferentes momentos, o (iii) en la que la partícula del vector lentivírico de la reivindicación 13 y el segundo vector lentivírico se administran por diferentes vías, o (iv) en la que la partícula del vector lentivírico de la reivindicación 13 y el segundo vector lentivírico se administran en diferentes sitios, o (v) en la que la partícula del vector lentivírico de la reivindicación 13 y el segundo vector lentivírico se administran en diferentes sitios, por la misma vía, o (vi) en la que la partícula del vector lentivírico se administra por vía intratumoral, o (vii) en la que la partícula del vector lentivírico de la reivindicación 13 se administra por vía intratumoral y el segundo vector lentivírico se administra simultáneamente en un sitio diferente y por una vía diferente.
21. Una composición que comprende la partícula del vector lentivírico de la reivindicación 16 para su uso en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de la composición.
22. La composición para el uso de la reivindicación 18, en la que el método comprende además administrar por vía intratumoral un agonista de TLR4.
23. La composición para el uso de la reivindicación 22, en donde el agonista de TLR4 es una formulación de emulsión acuosa o de aceite en agua de glucopiranosil lípido A (GLA).
24. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 20 (vi) en donde la composición que comprende la partícula del vector lentivírico comprende además una formulación acuosa de glucopiranosil lípido A (GLA).
25. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 20 (vi) en la que la partícula del vector lentivírico se administra en una dosis única.
26. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 20 (vi) en la que la partícula del vector lentivírico produce un nivel bajo de IL-12 y en donde el nivel bajo de IL-12 está entre aproximadamente 0,1 μ g y 1 μ g/1E10 genomas de vector producido durante las primeras 48 horas, medido en un ensayo de transducción *in vitro*.
27. La composición para el uso de la reivindicación 26 o de la reivindicación 21, en donde la partícula del vector lentivírico se administra por vía intratumoral.

28. La partícula del vector lentivírico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13-17 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto humano o animal.

5 29. Una composición que comprende la partícula del vector lentivírico según la reivindicación 13 y una segunda partícula del vector lentivírico que codifica un antígeno tumoral.

30. Una vacuna terapéutica o profiláctica que comprende las partículas del vector lentivírico de la reivindicación 16 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

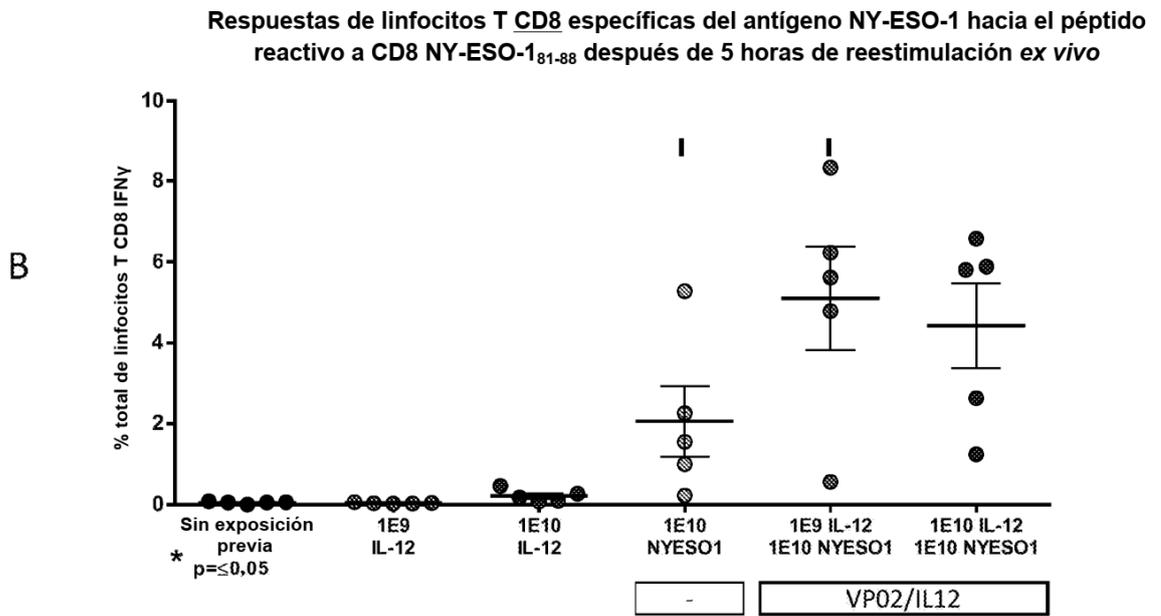
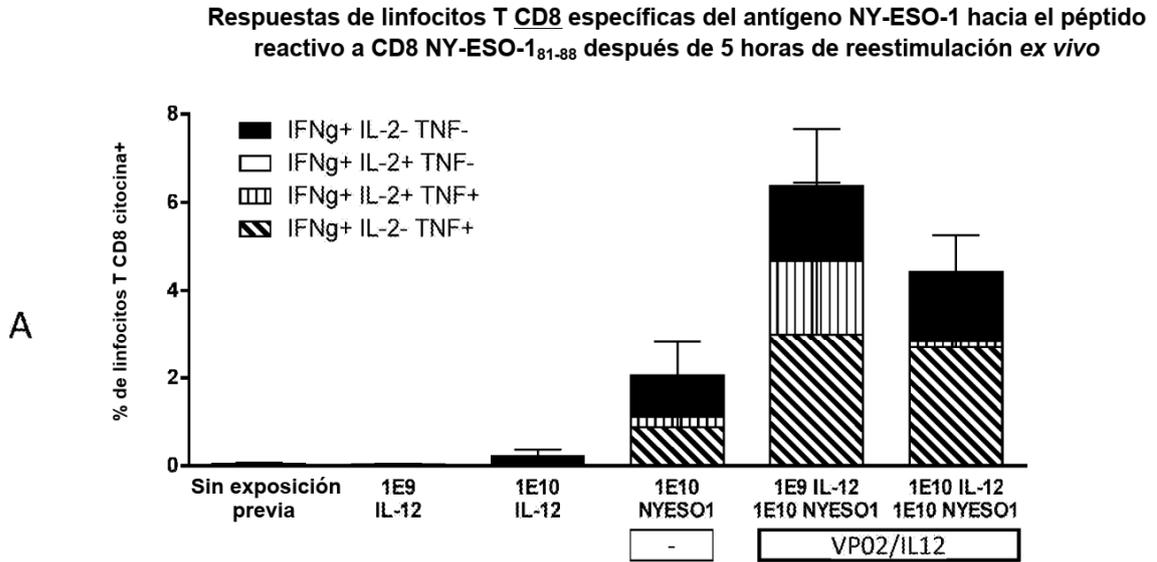


Figura 2

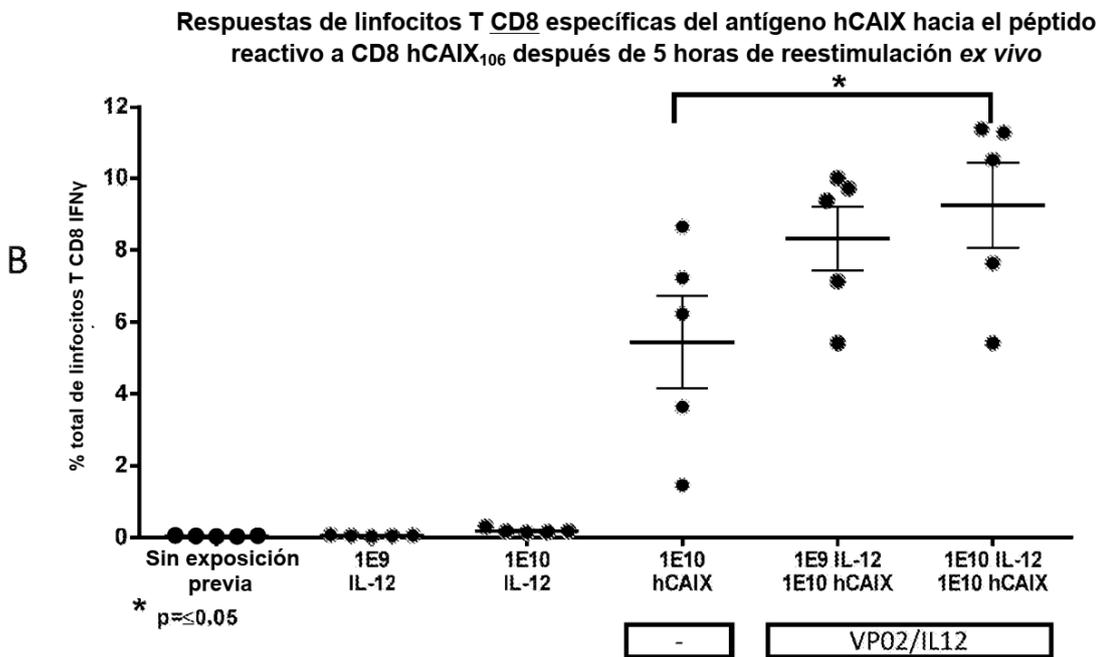
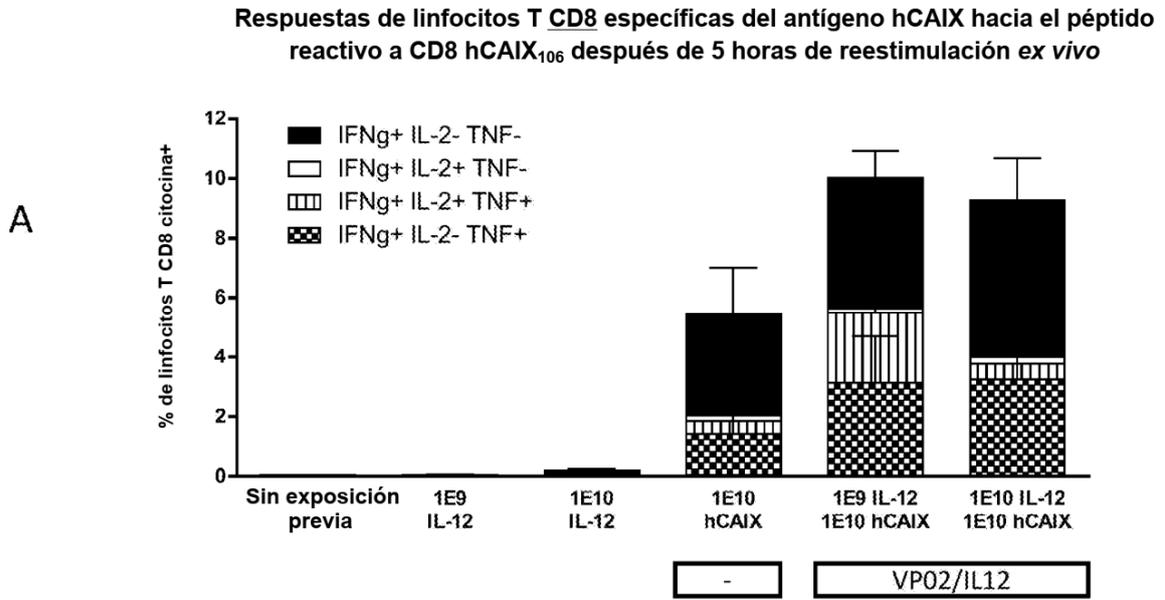
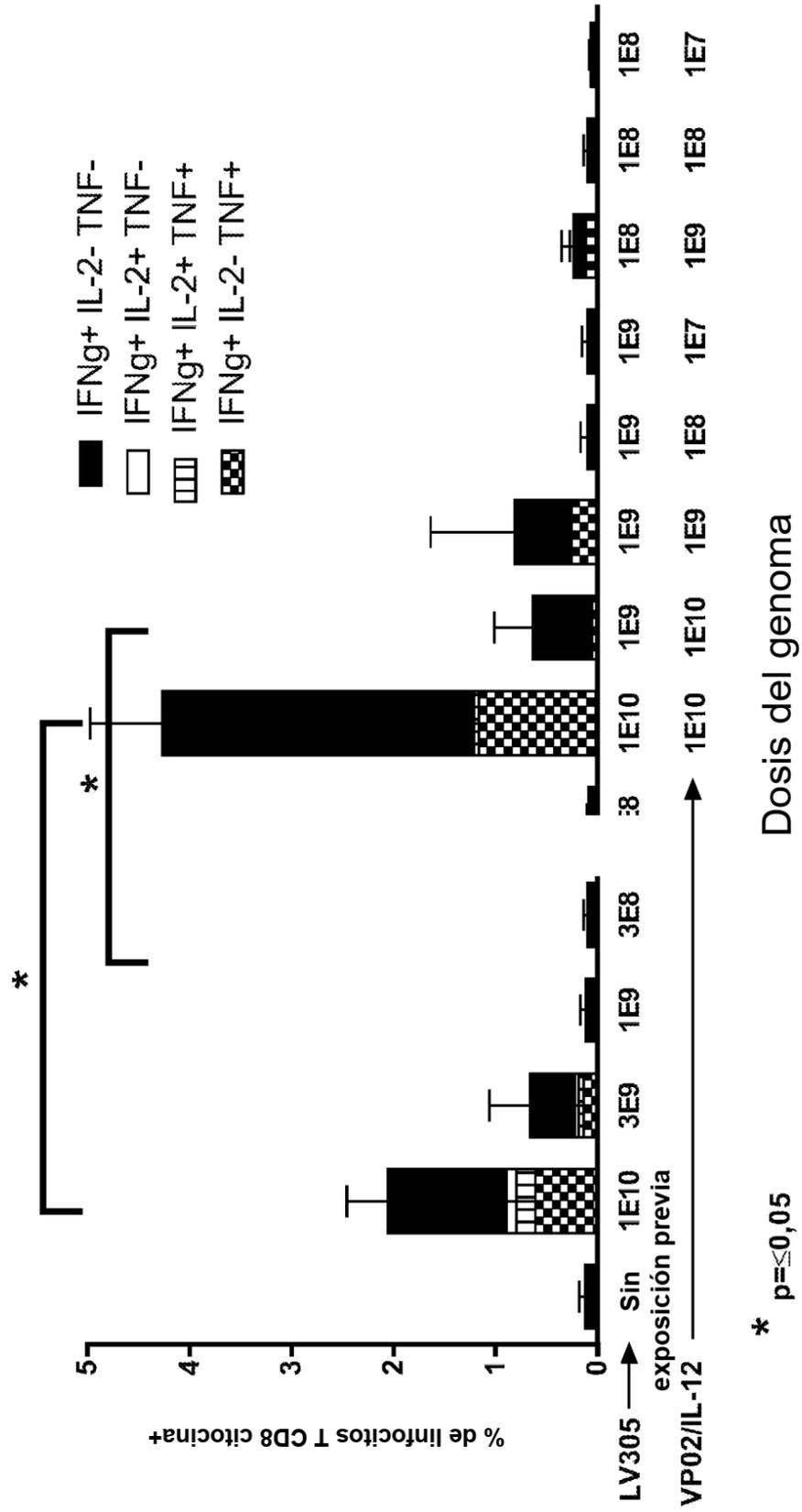


Figura 3

A

Respuestas de linfocitos T CD8 específicas del antígeno NY-ESO-1 hacia el péptido reactivo a CD8 NY-ESO-1₈₁₋₈₈ después de 5 horas de reestimulación *ex vivo*



* $p \leq 0,05$



Figura 3

B

Respuestas de linfocitos T CD8 específicas del antígeno NY-ESO-1 hacia el péptido reactivo a CD8 NY-ESO-1₈₁₋₈₈ después de 5 horas de reestimulación *ex vivo*

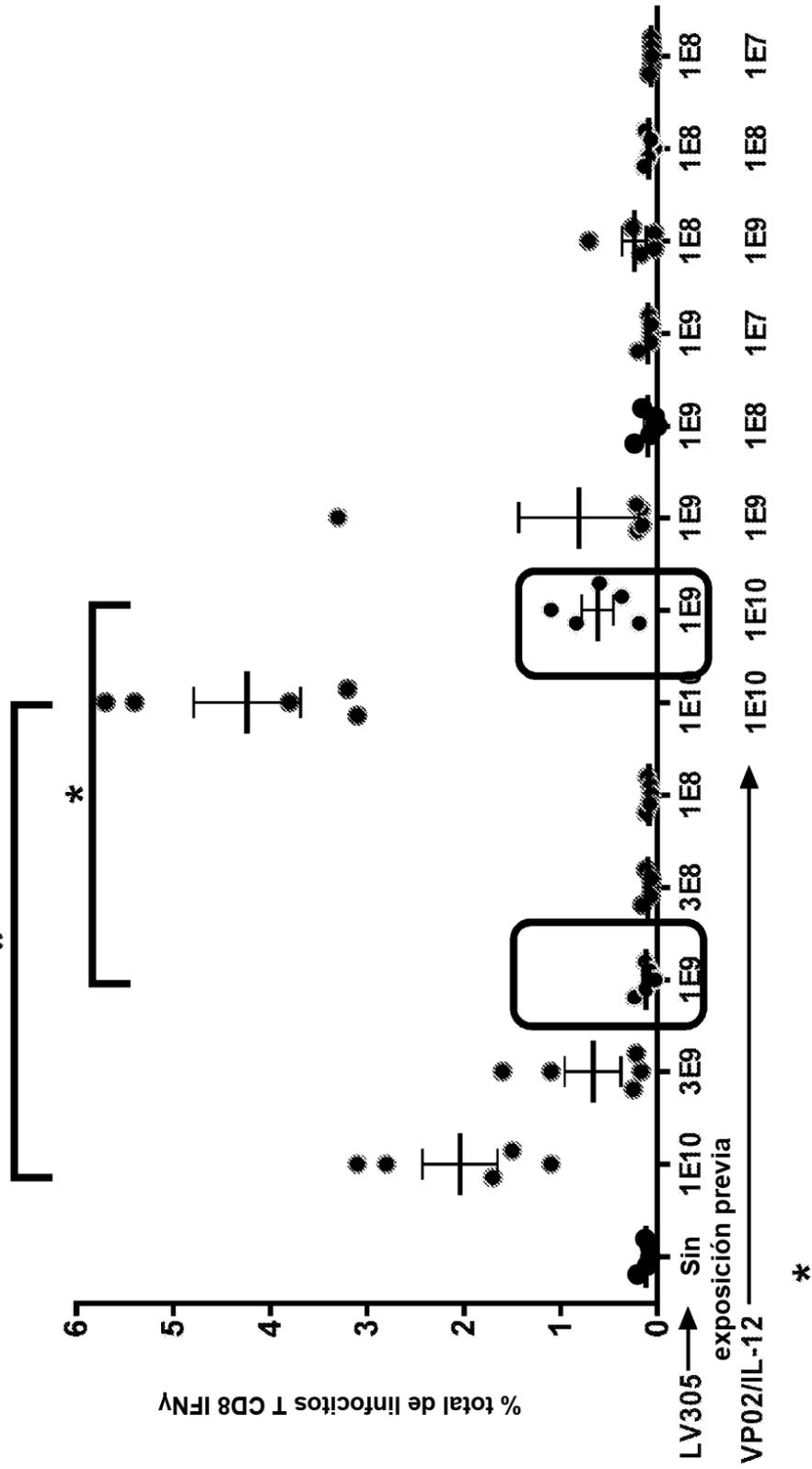
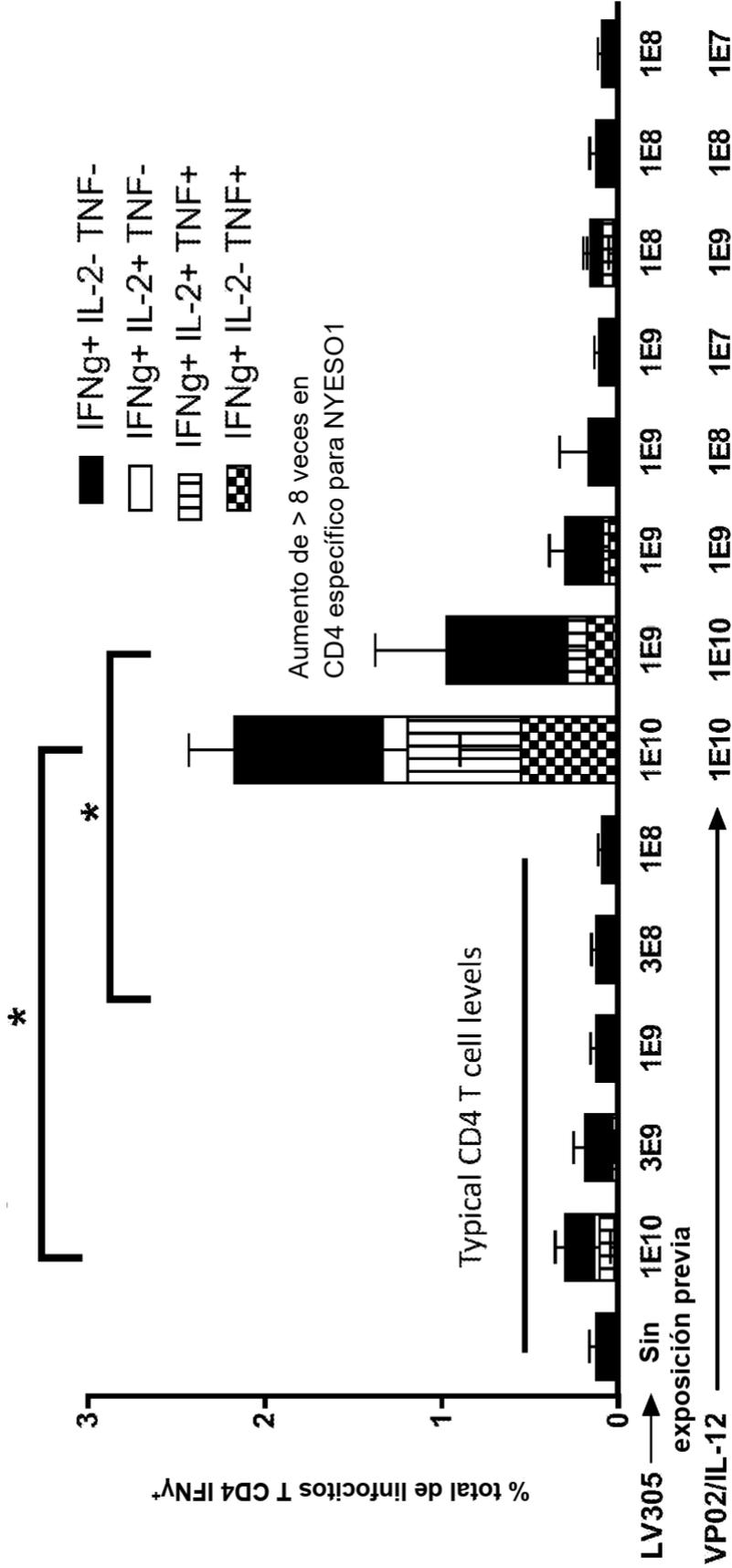


Figura 4

A

Respuestas de linfocitos T CD4 específicas del antígeno NY-ESO-1 hacia el péptido reactivo a CD8 NY-ESO-1₉₀₋₁₀₇ después de 5 horas de reestimulación *ex vivo*



* p ≤ 0,05

Dosis del genoma

Sin VP02/IL-12 VP02/IL-12

Figura 4 B

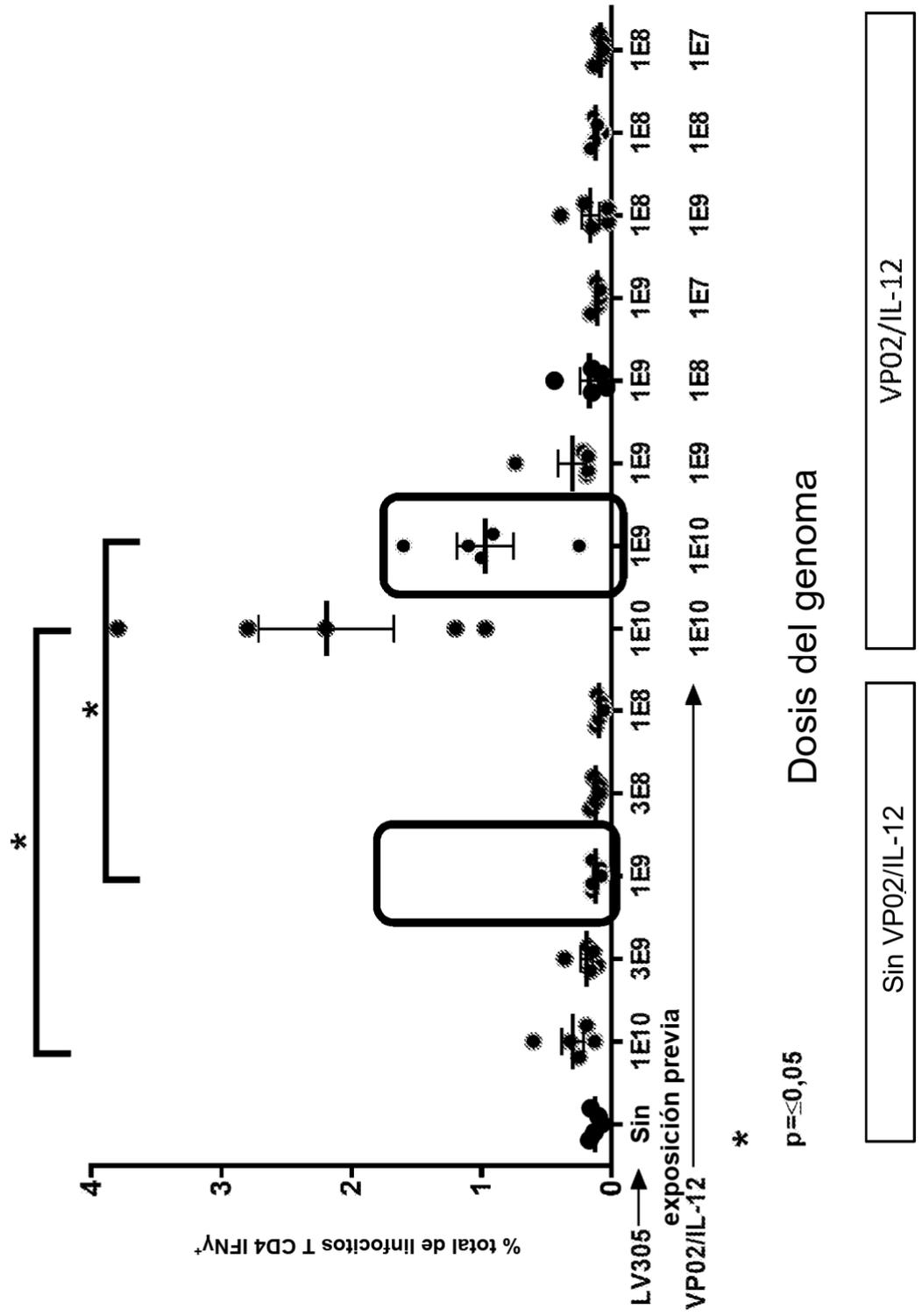


Figura 5 A

Respuestas de linfocitos T CD8 específicas del antígeno NY-ESO-1 hacia el péptido reactivo a CD8 NY-ESO-1₈₁₋₈₈ después de 5 horas de reestimulación *ex vivo*

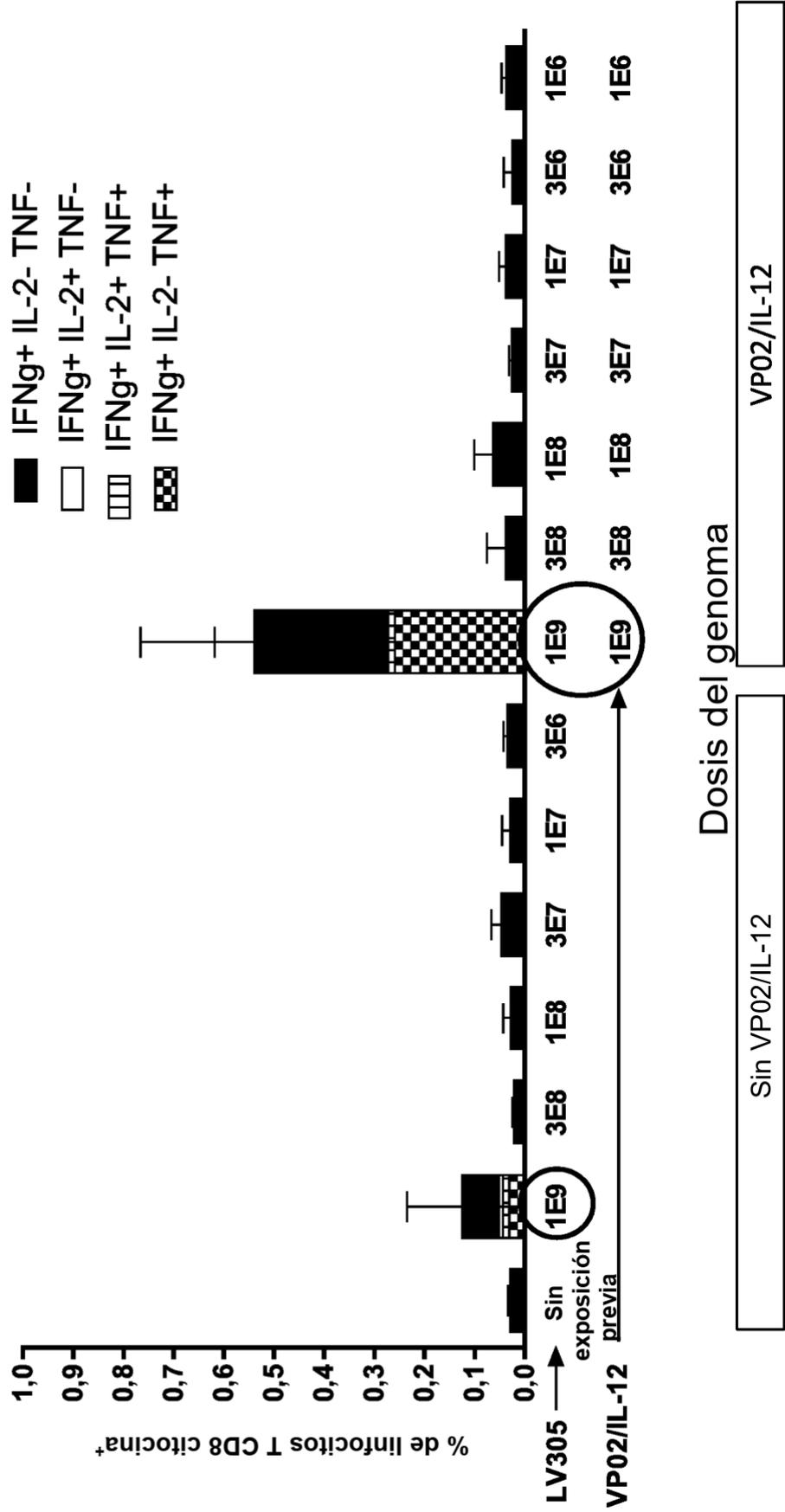


Figura 5

B

Respuestas de linfocitos T CD8 específicas del antígeno NY-ESO-1 hacia el péptido reactivo a CD8 NY-ESO-1₈₁₋₈₈ después de 5 horas de reestimulación *ex vivo*

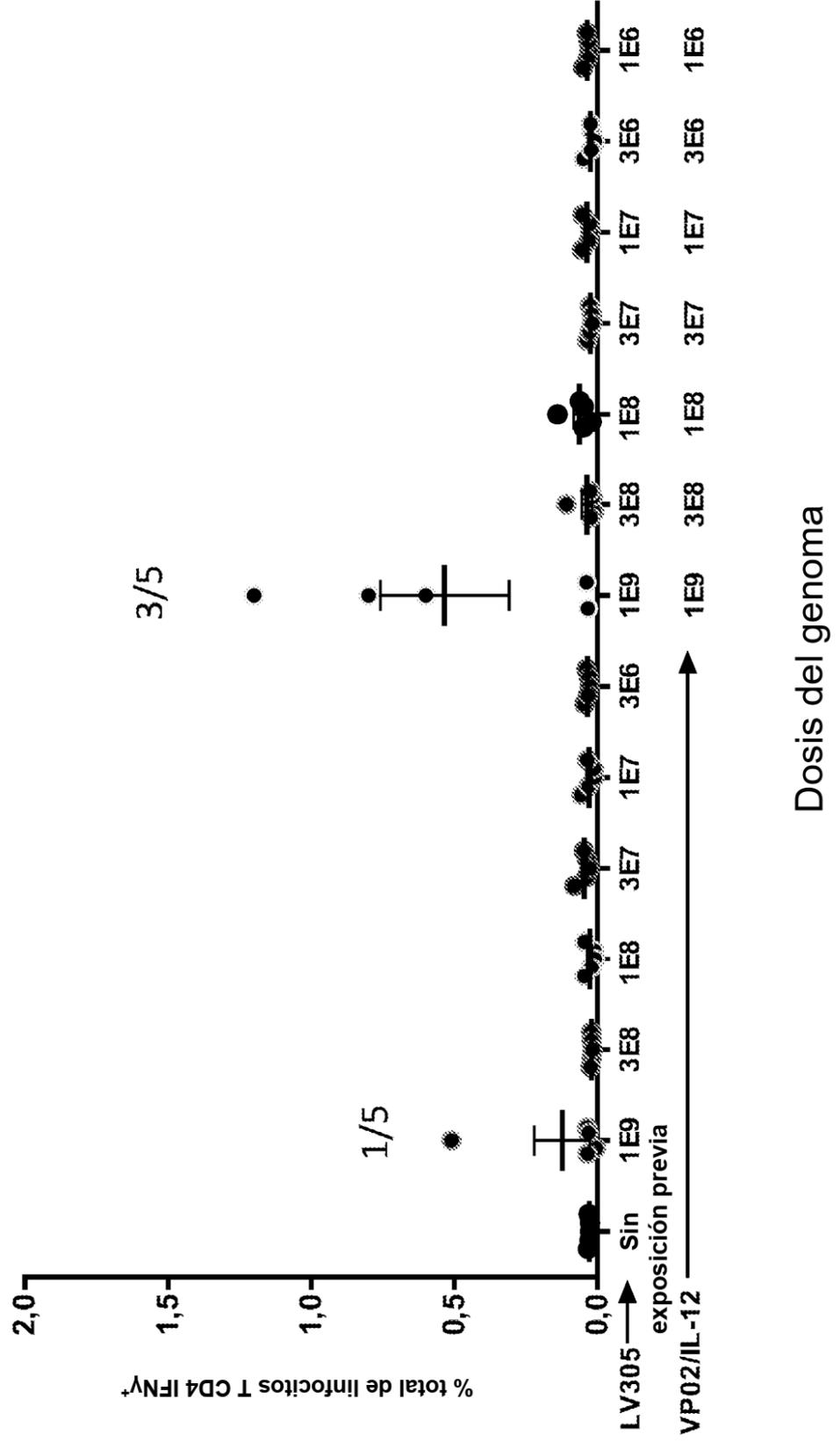


Figura 5

C

Respuestas de linfocitos T CD4 específicas del antígeno NY-ESO-1 hacia el péptido reactivo a CD8 NY-ESO-1₉₀₋₁₀₇ después de 5 horas de reestimulación ex vivo

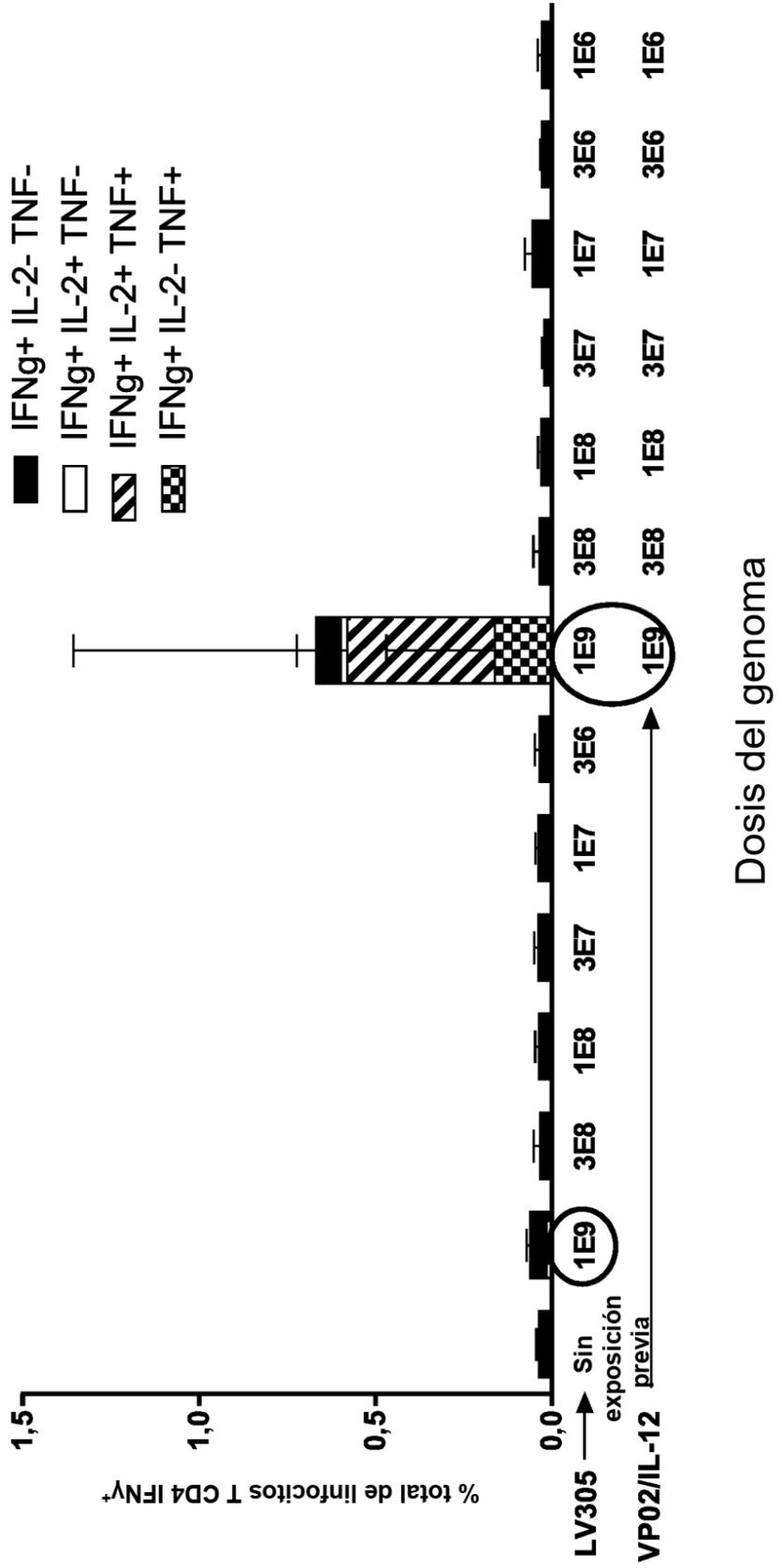


Figura 5 D

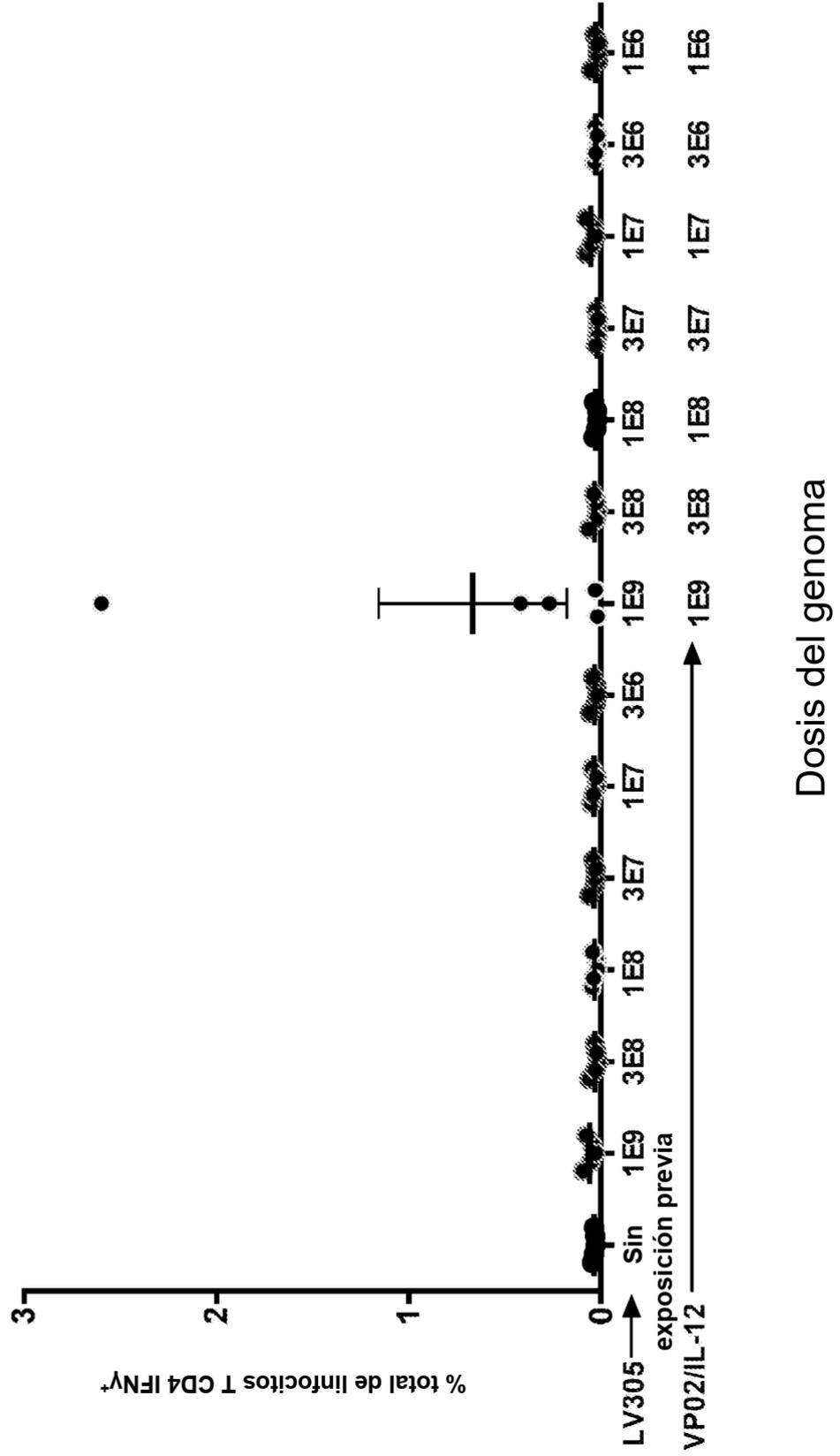
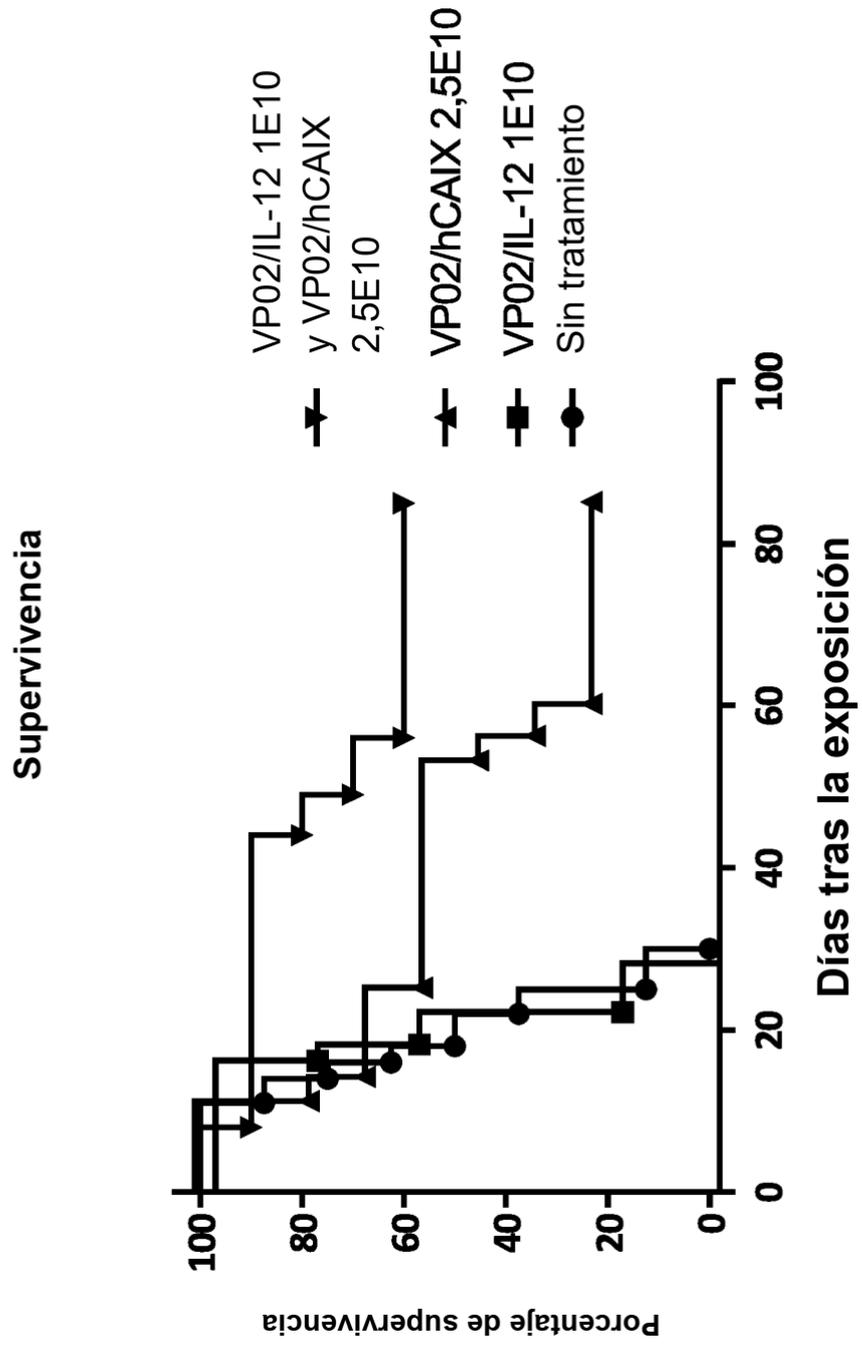


Figura 6



n=10

P=0,122 (prueba log-rank de Mantel-Cox)

Figura 7

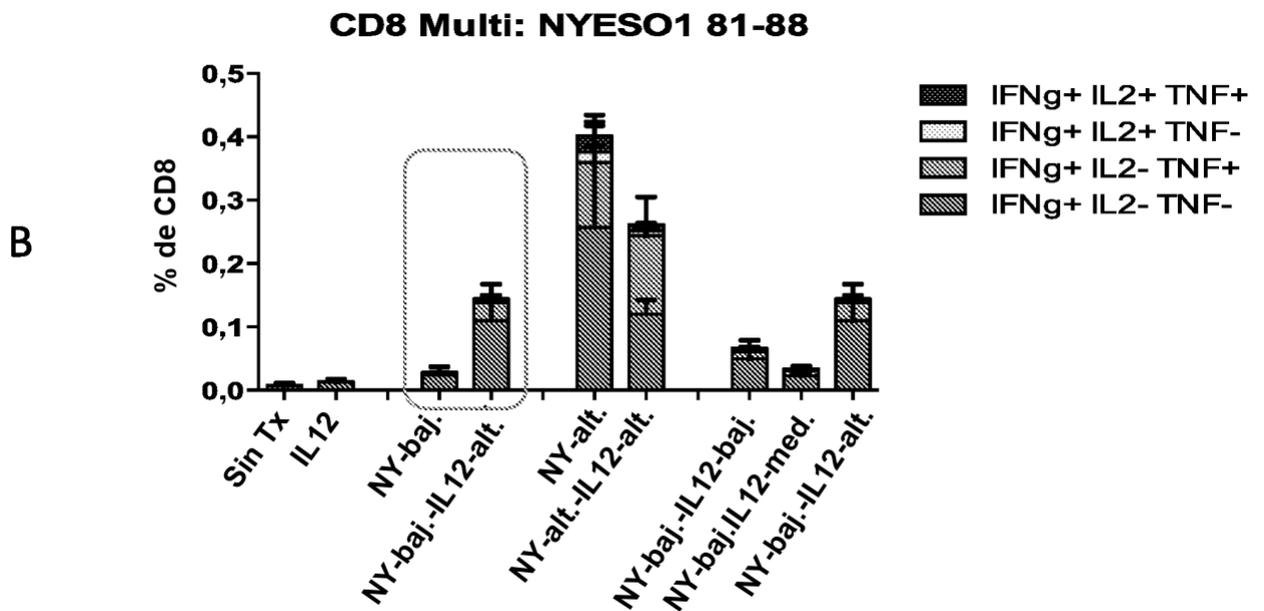
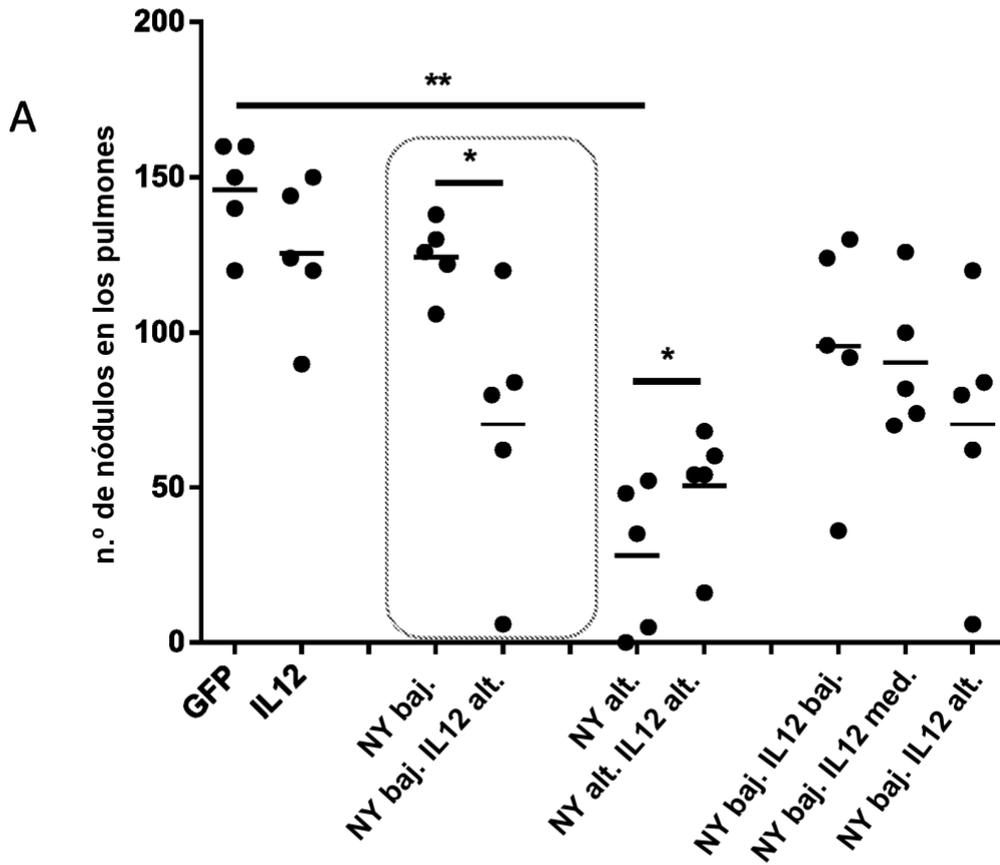


Figura 8

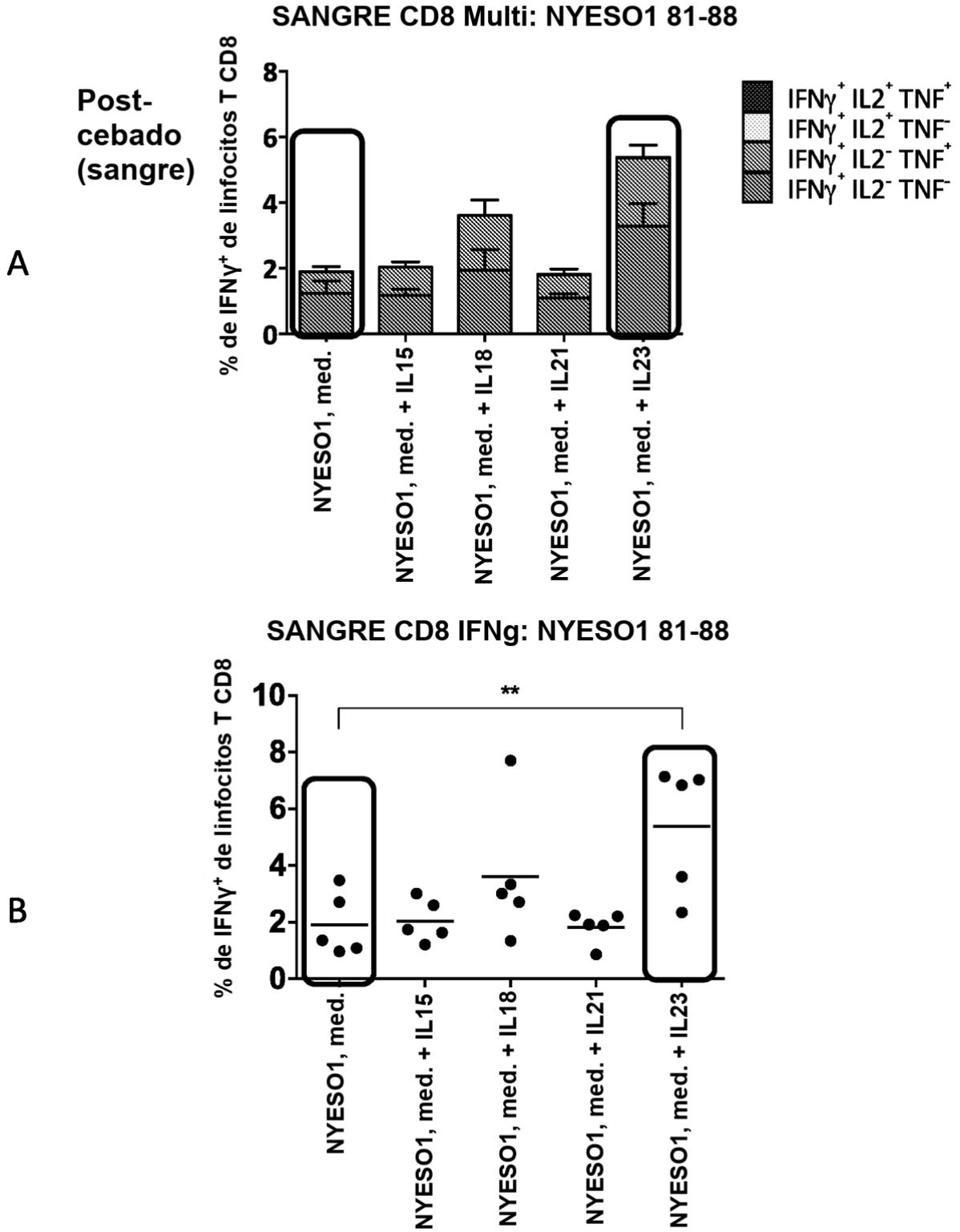


Figura 9

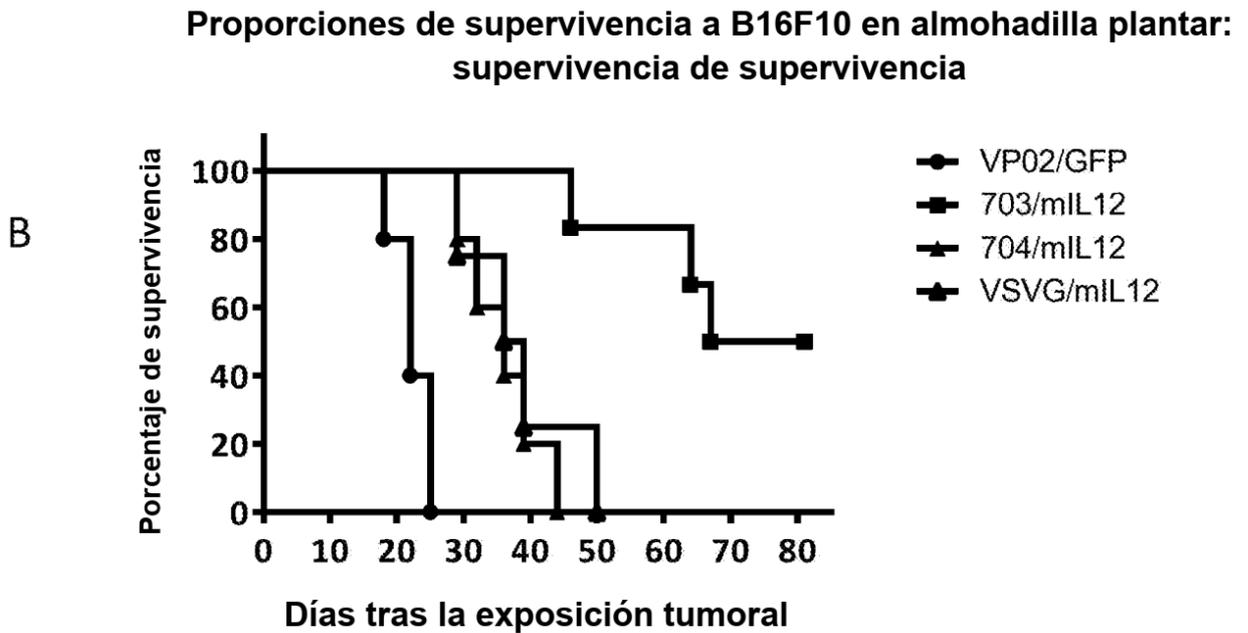
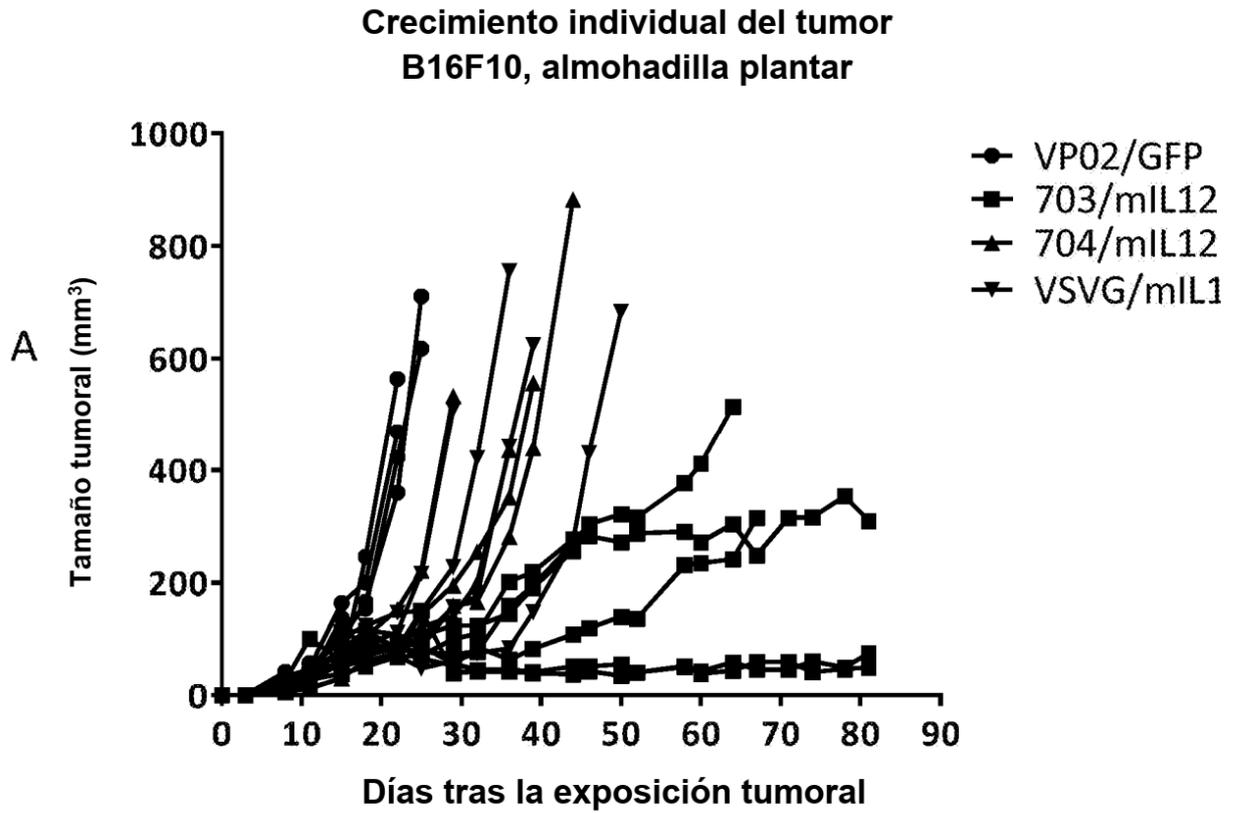


Figura 10

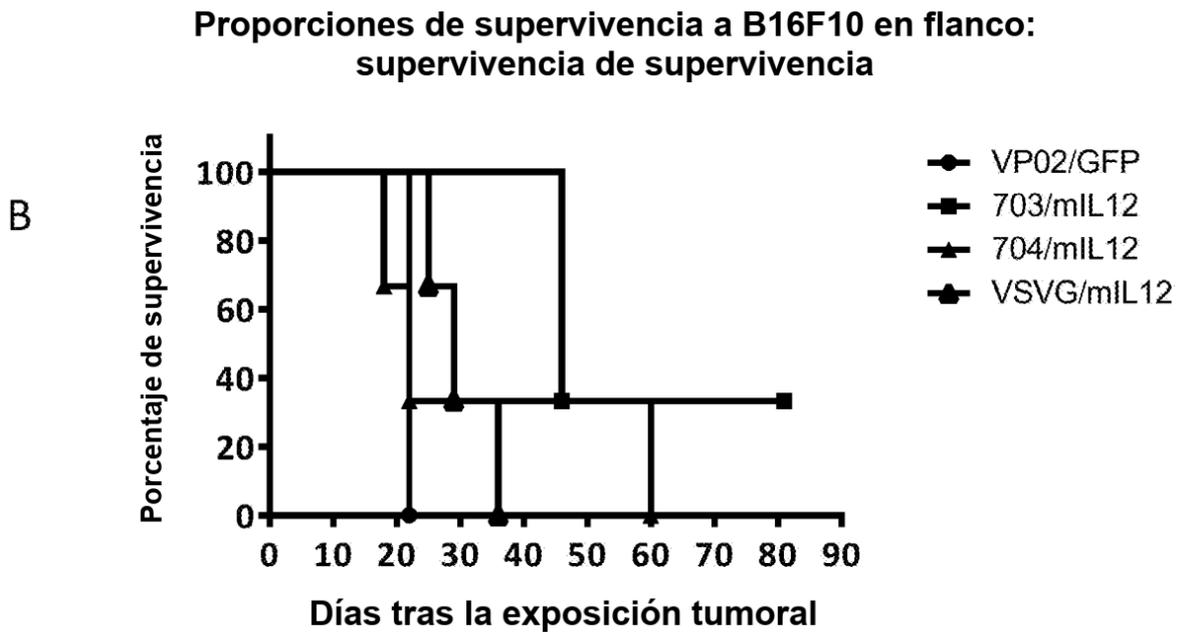
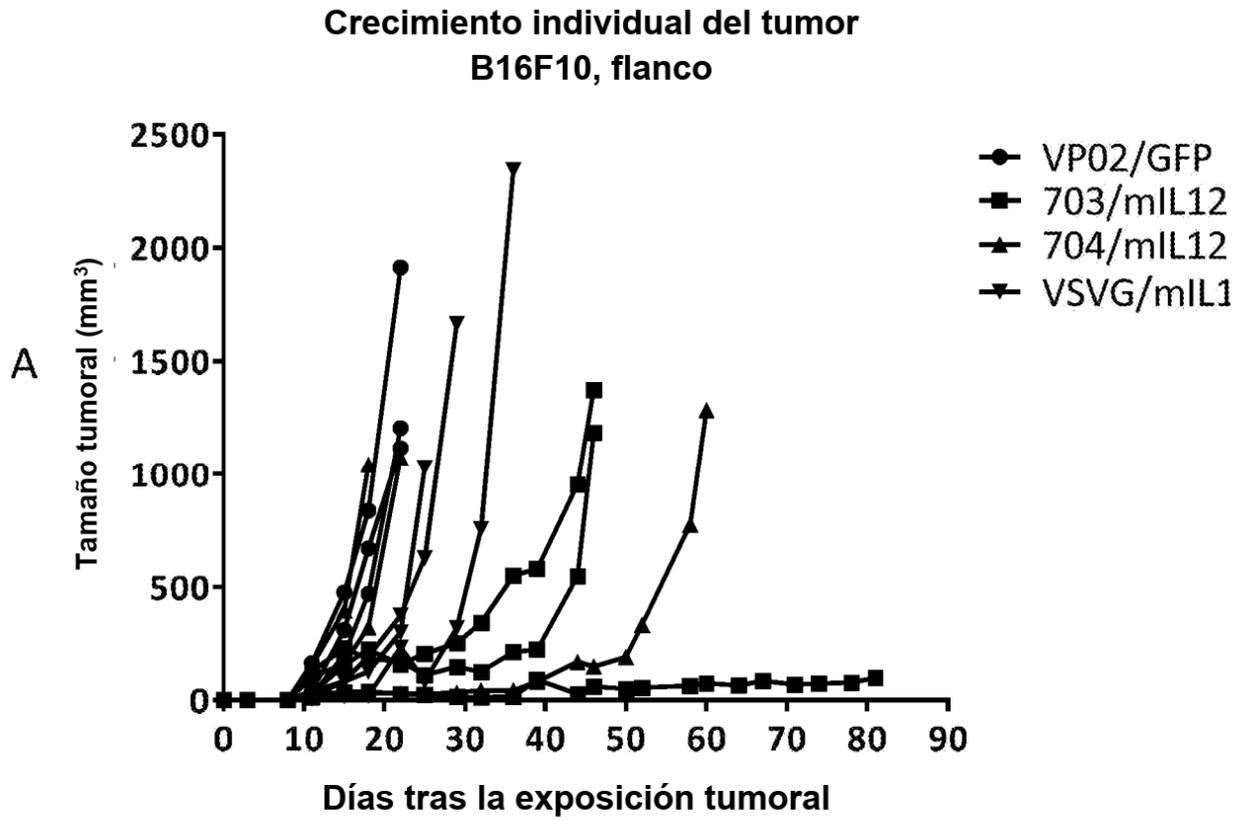
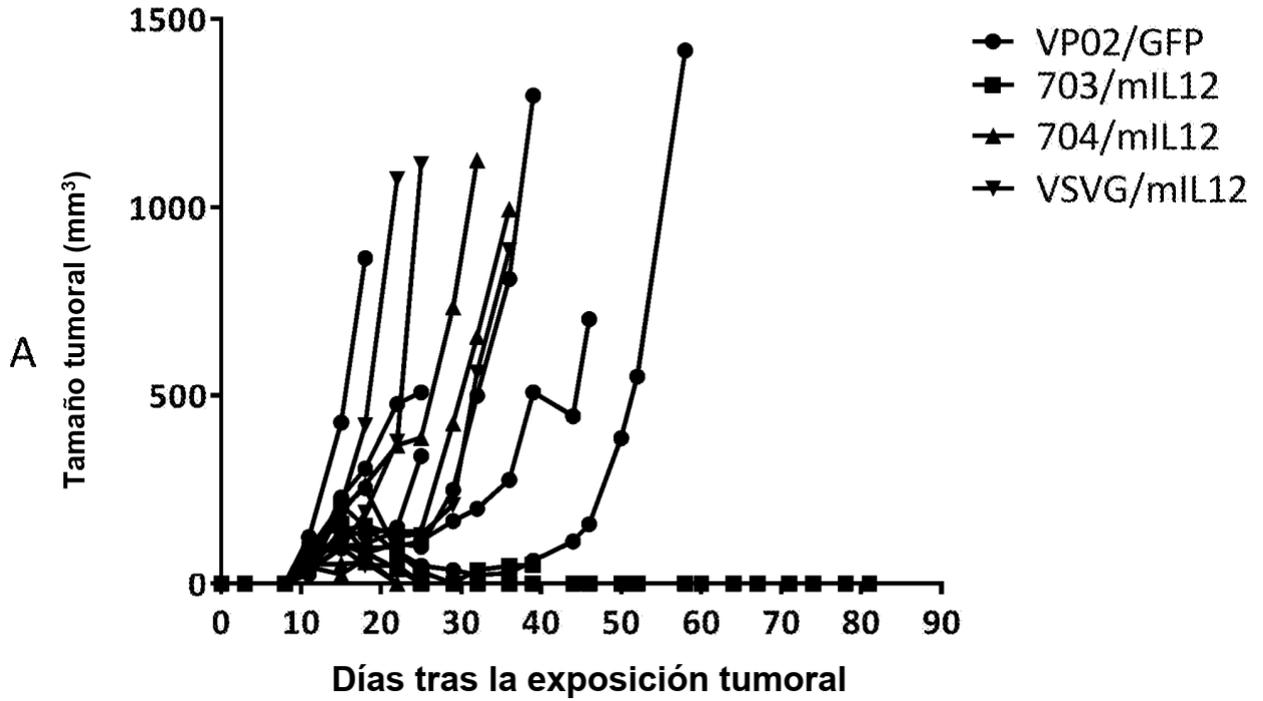


Figura 11

**Crecimiento individual del tumor
P815, flanco**



**Proporciones de supervivencia a P815
en flanco: supervivencia de supervivencia**

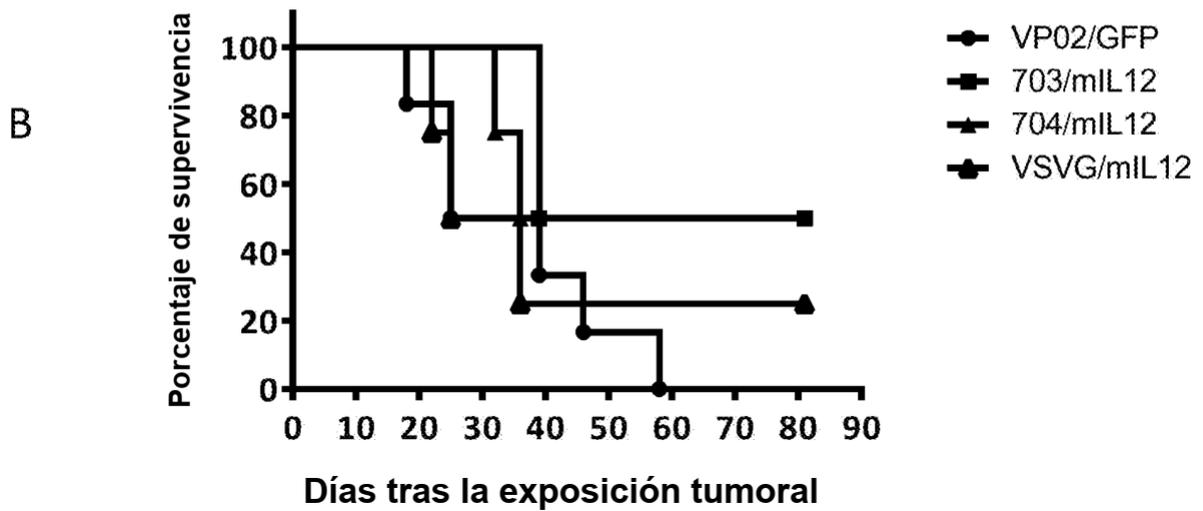


Figura 12

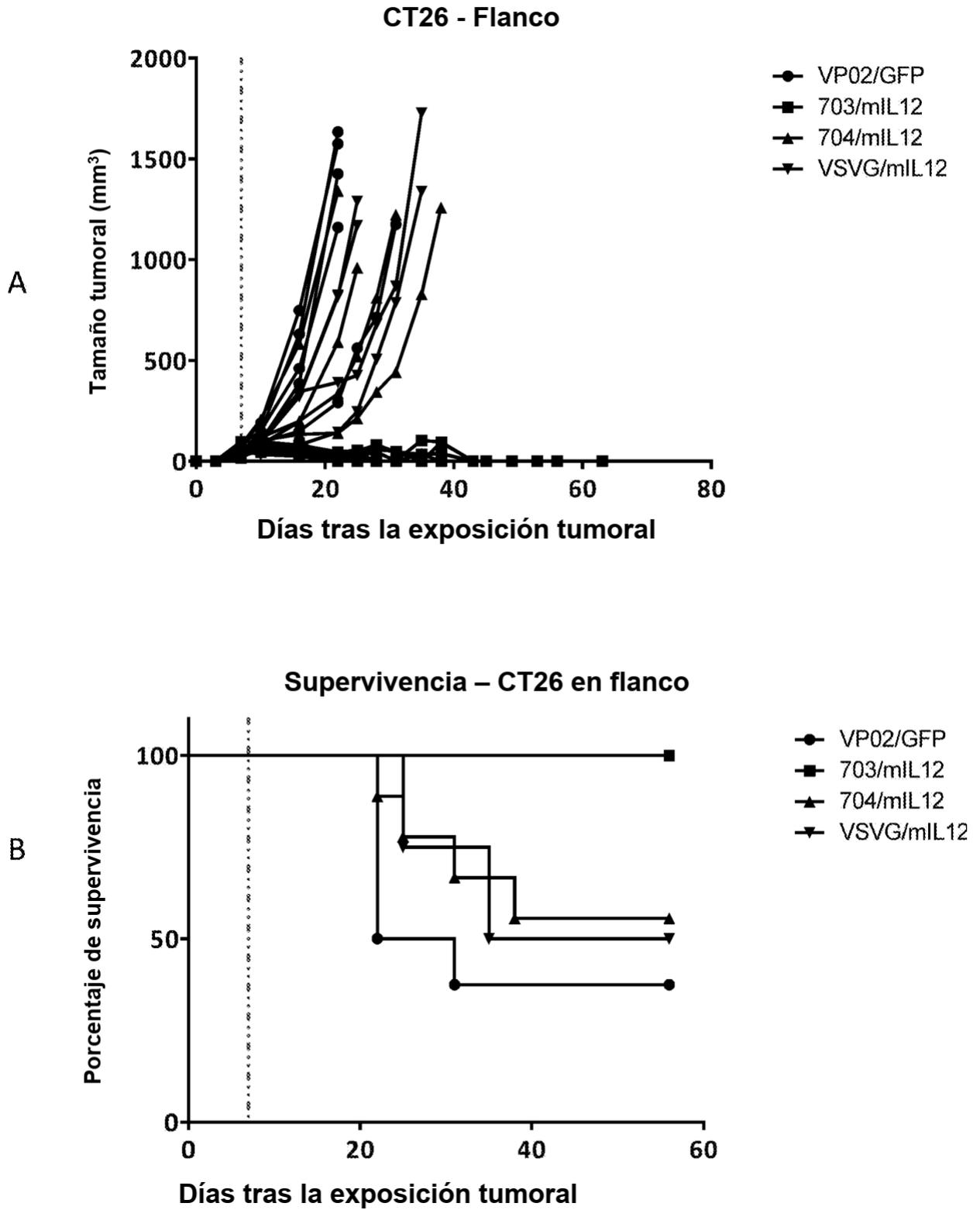


Figura 13

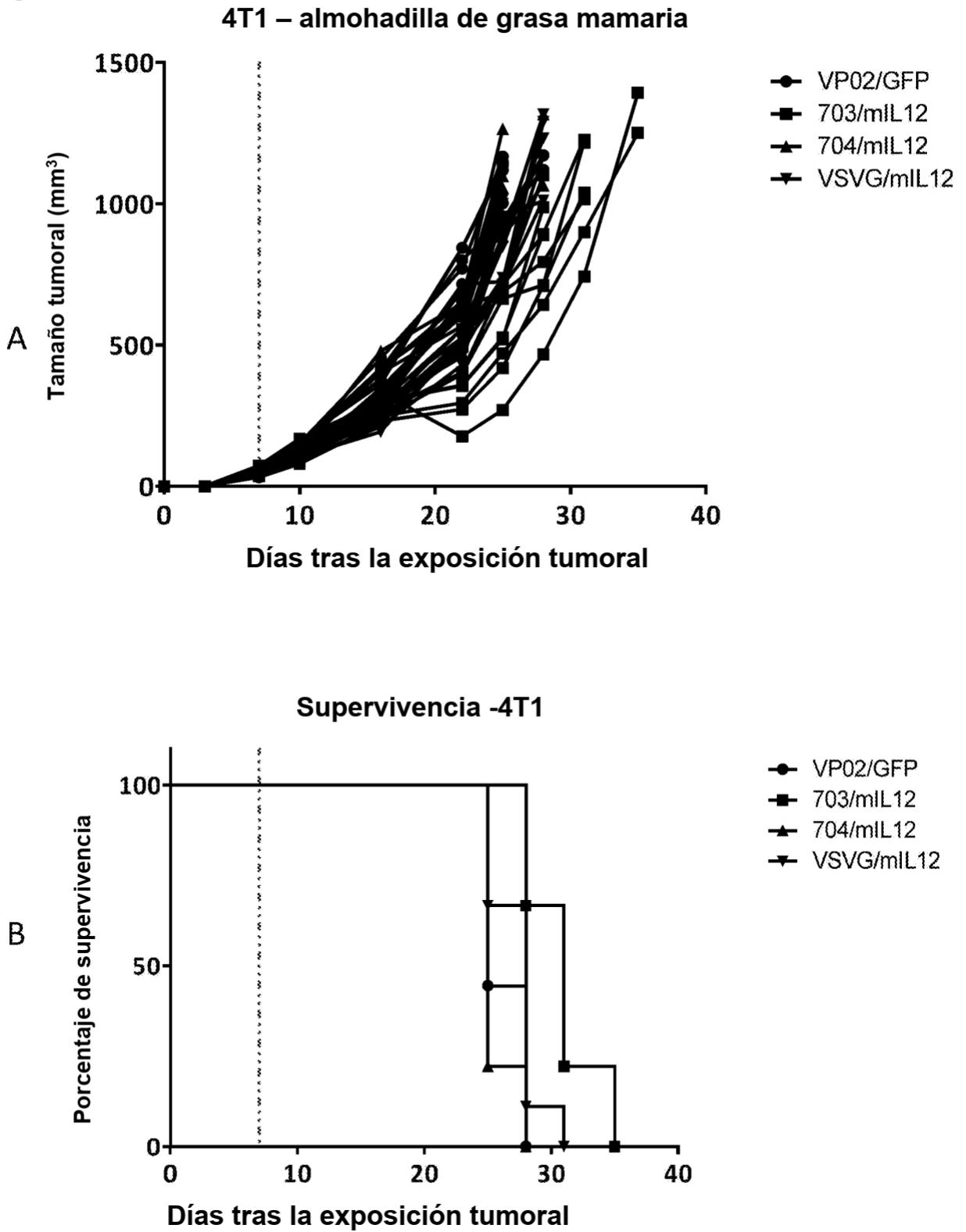


Figura 14

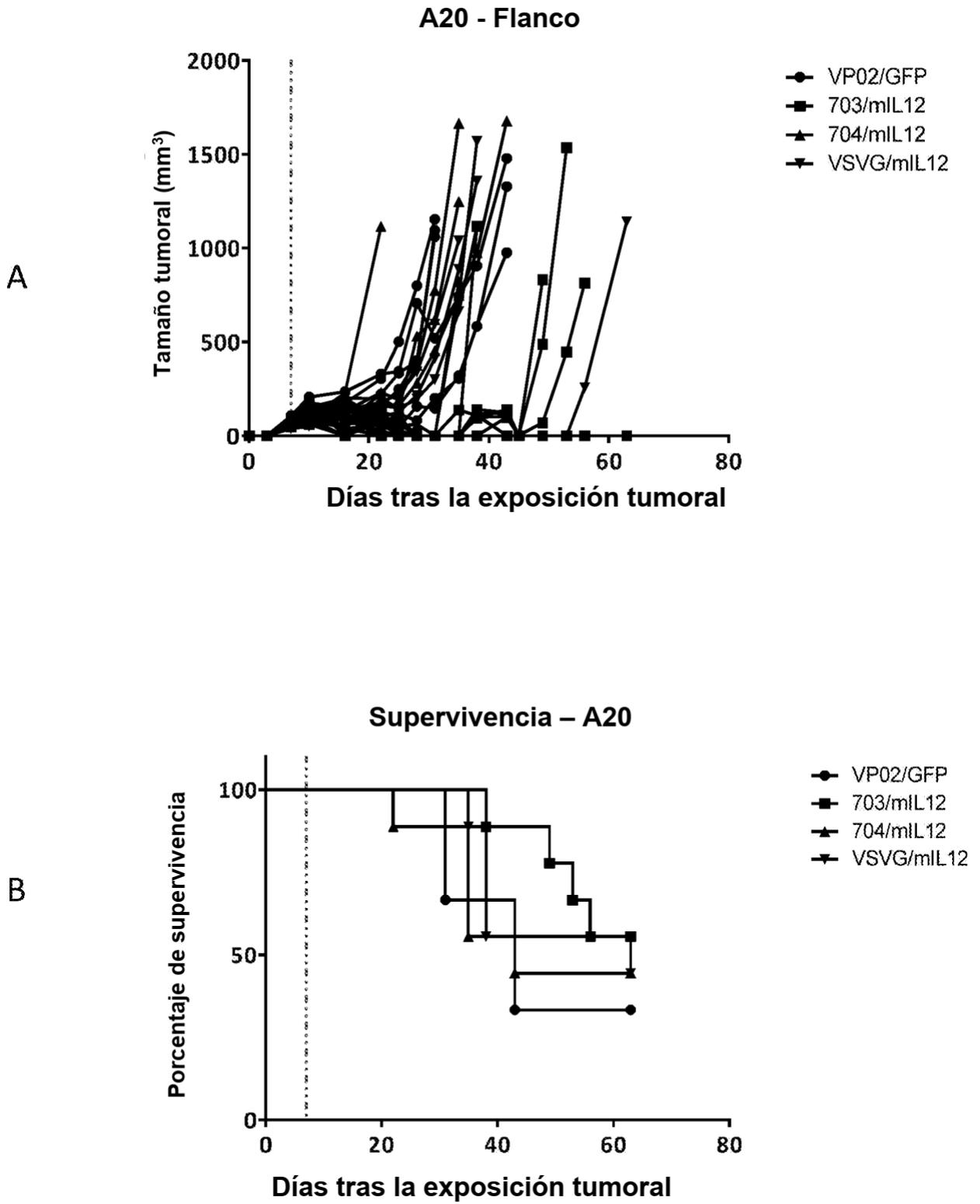


Figura 15

A

Respuestas de linfocitos T CD4 específicas del antígeno NY-ESO-1 hacia el péptido reactivo a CD4 NY-ESO-1₉₀₋₁₀₇ después de 5 horas de reestimulación *ex vivo*

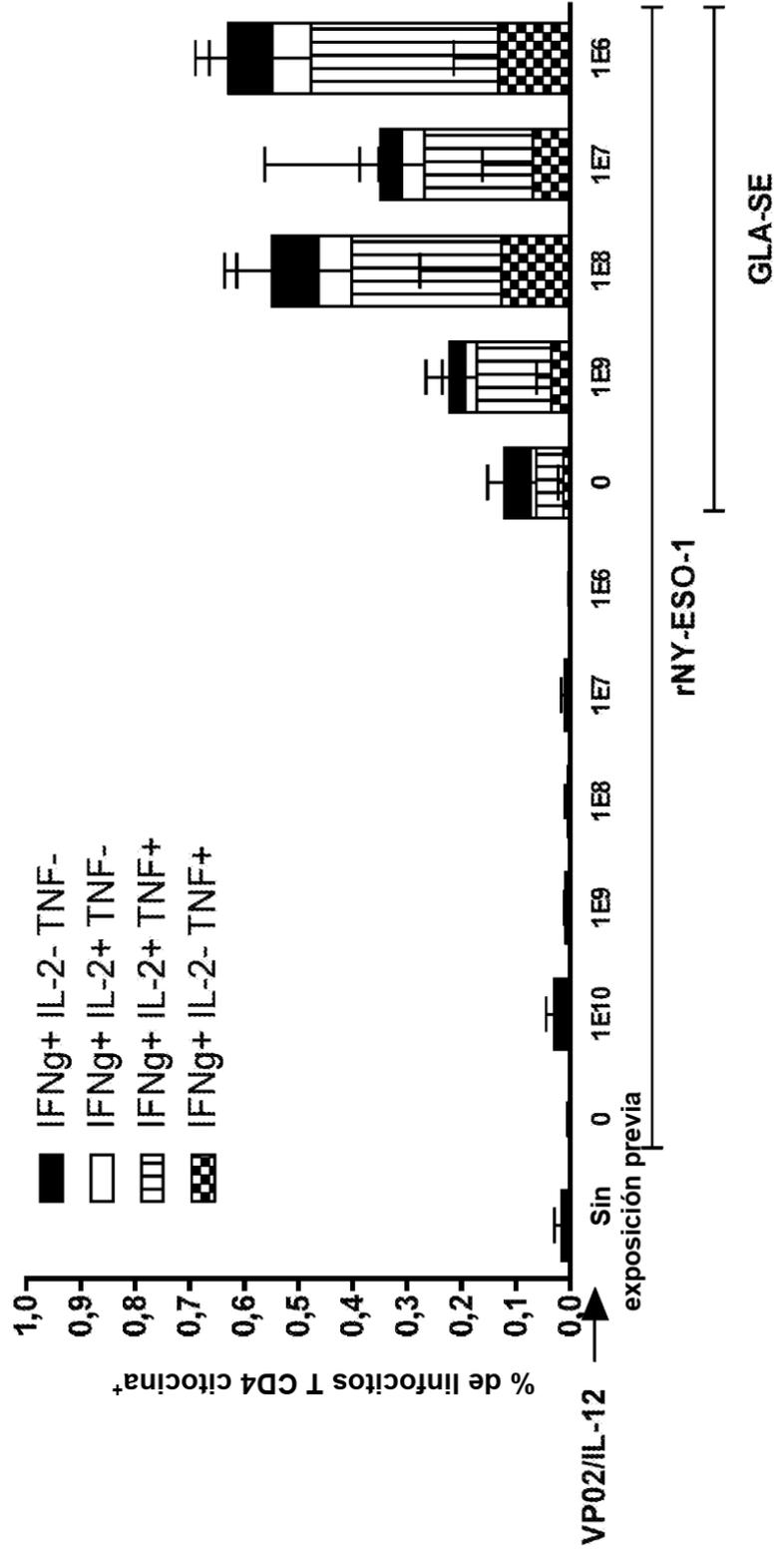


Figura 15

B

Respuestas de linfocitos T CD4 específicas del antígeno NY-ESO-1 hacia el péptido reactivo a CD4 NY-ESO-1₉₀₋₁₀₇ después de 5 horas de reestimulación ex vivo

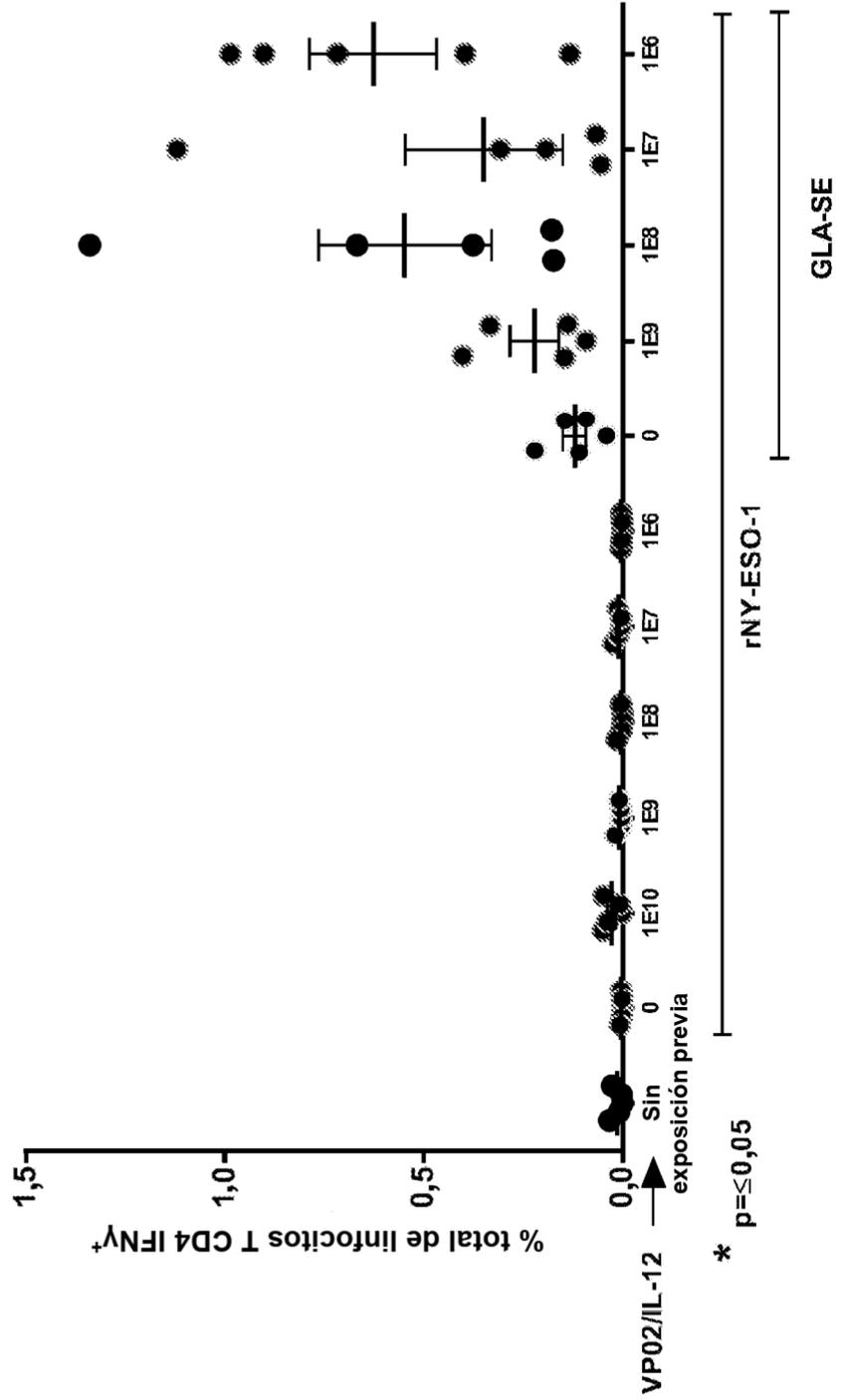


Figura 16

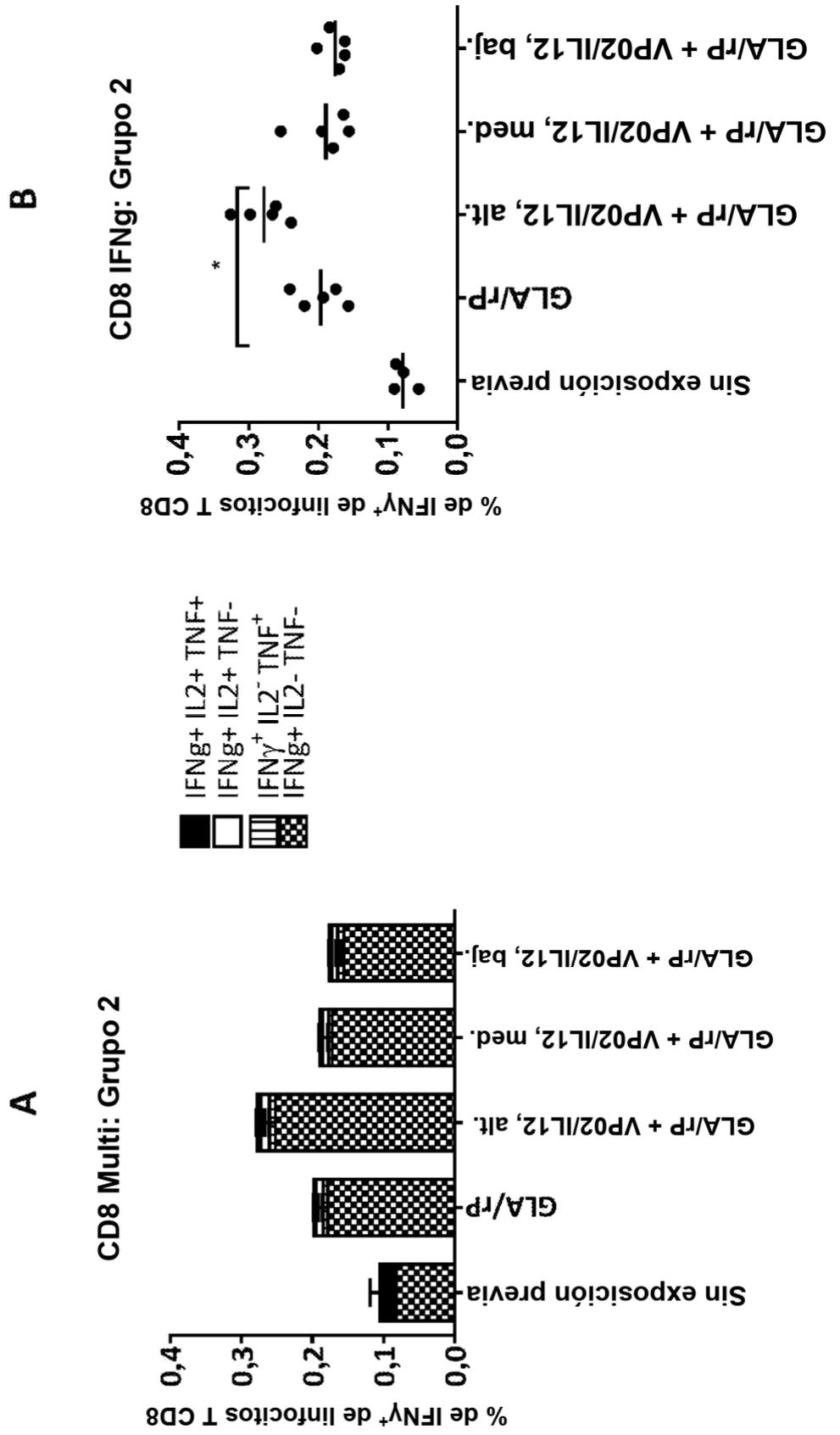


Figura 16

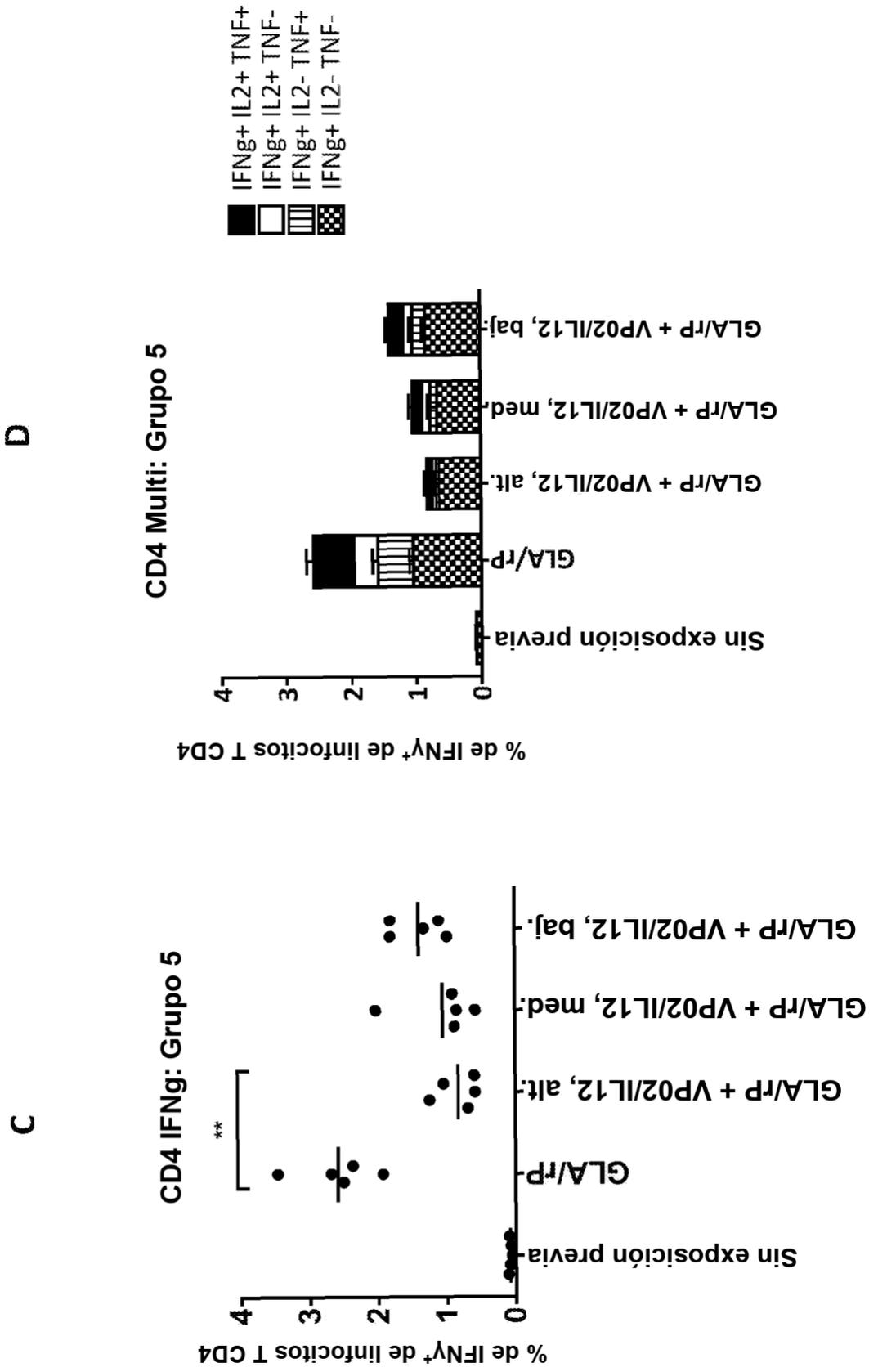


Figura 17

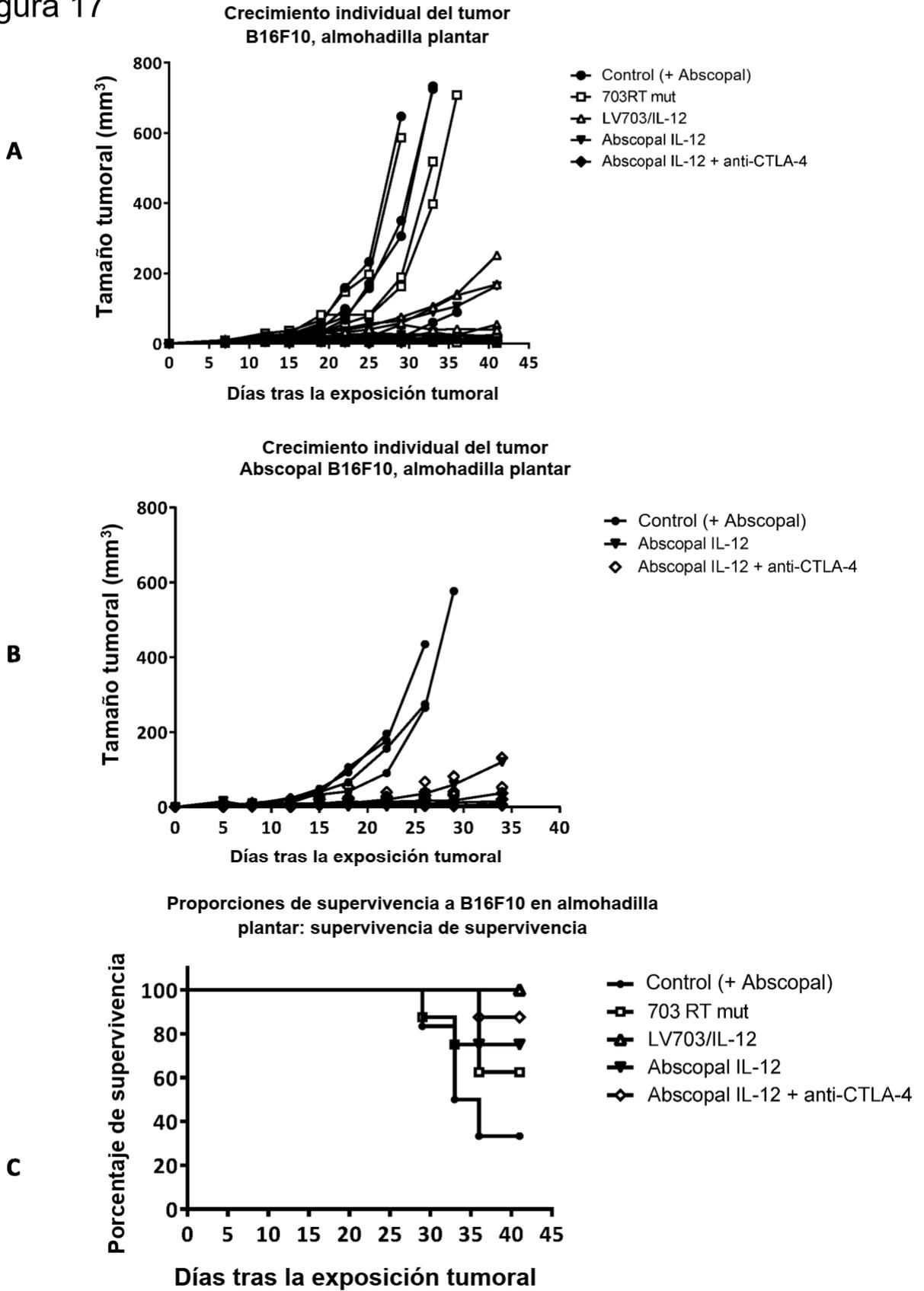


Figura 18

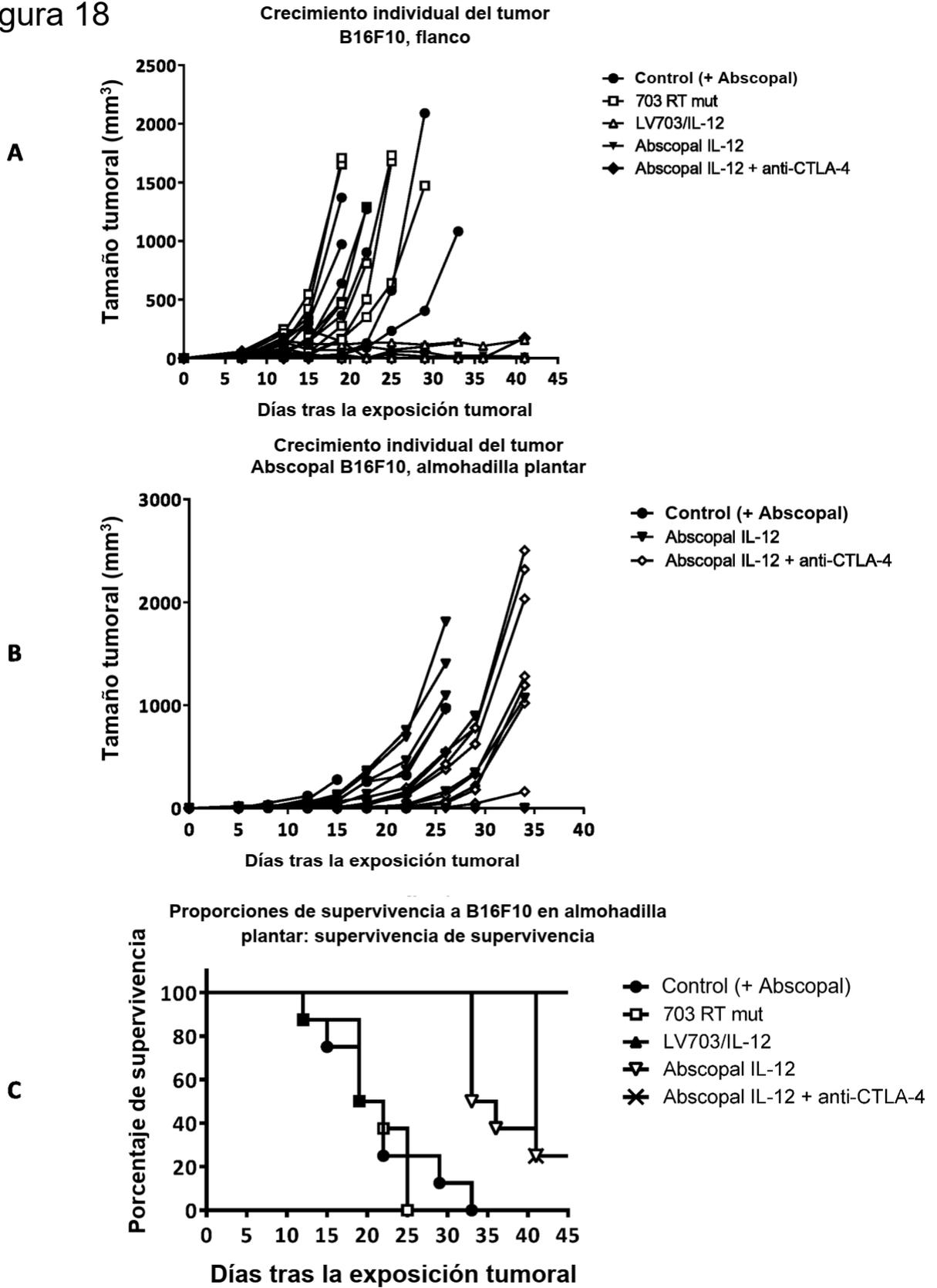


Figura 19

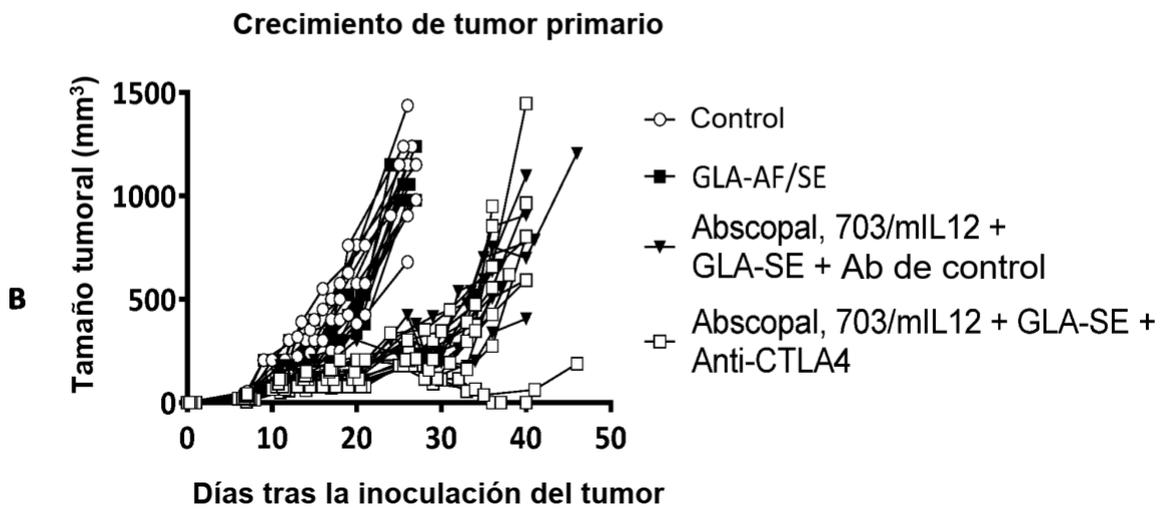
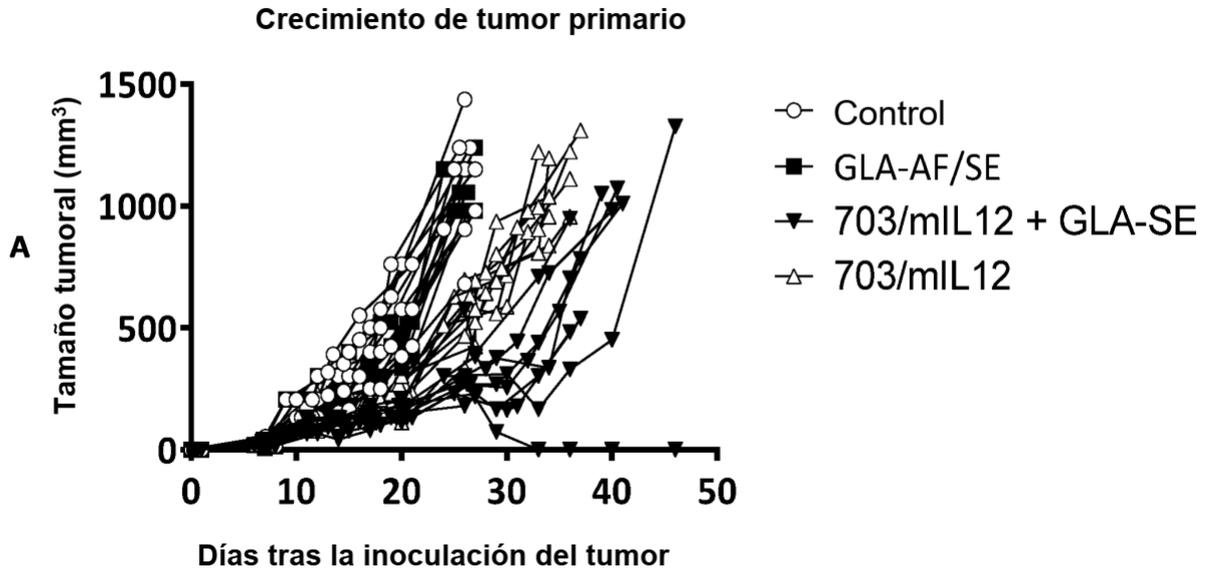


Figura 19

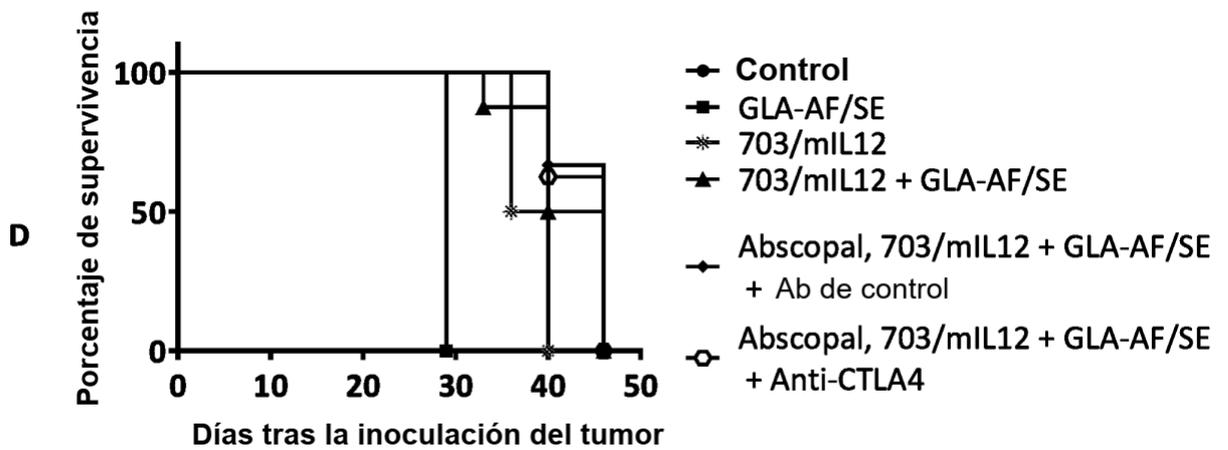
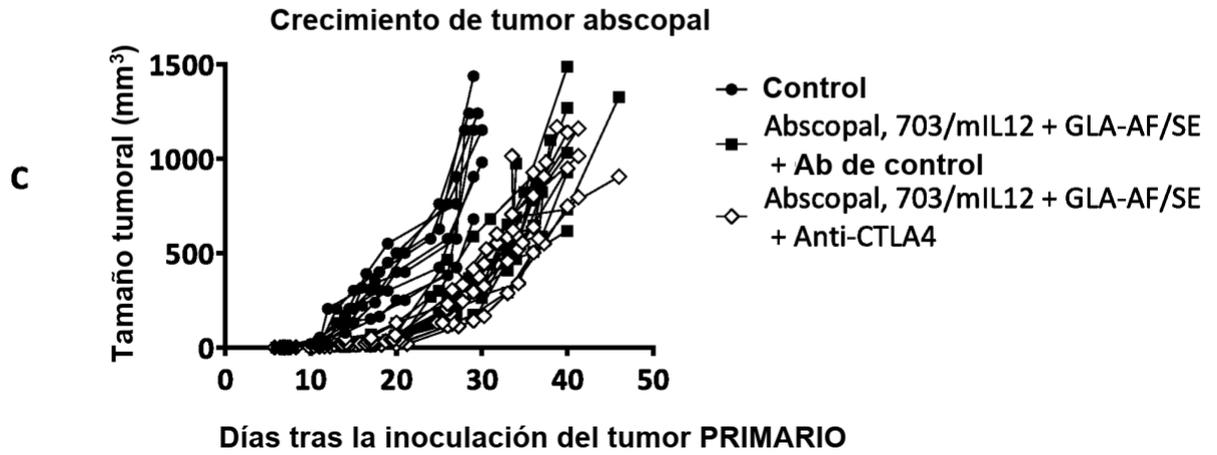


Figura 20

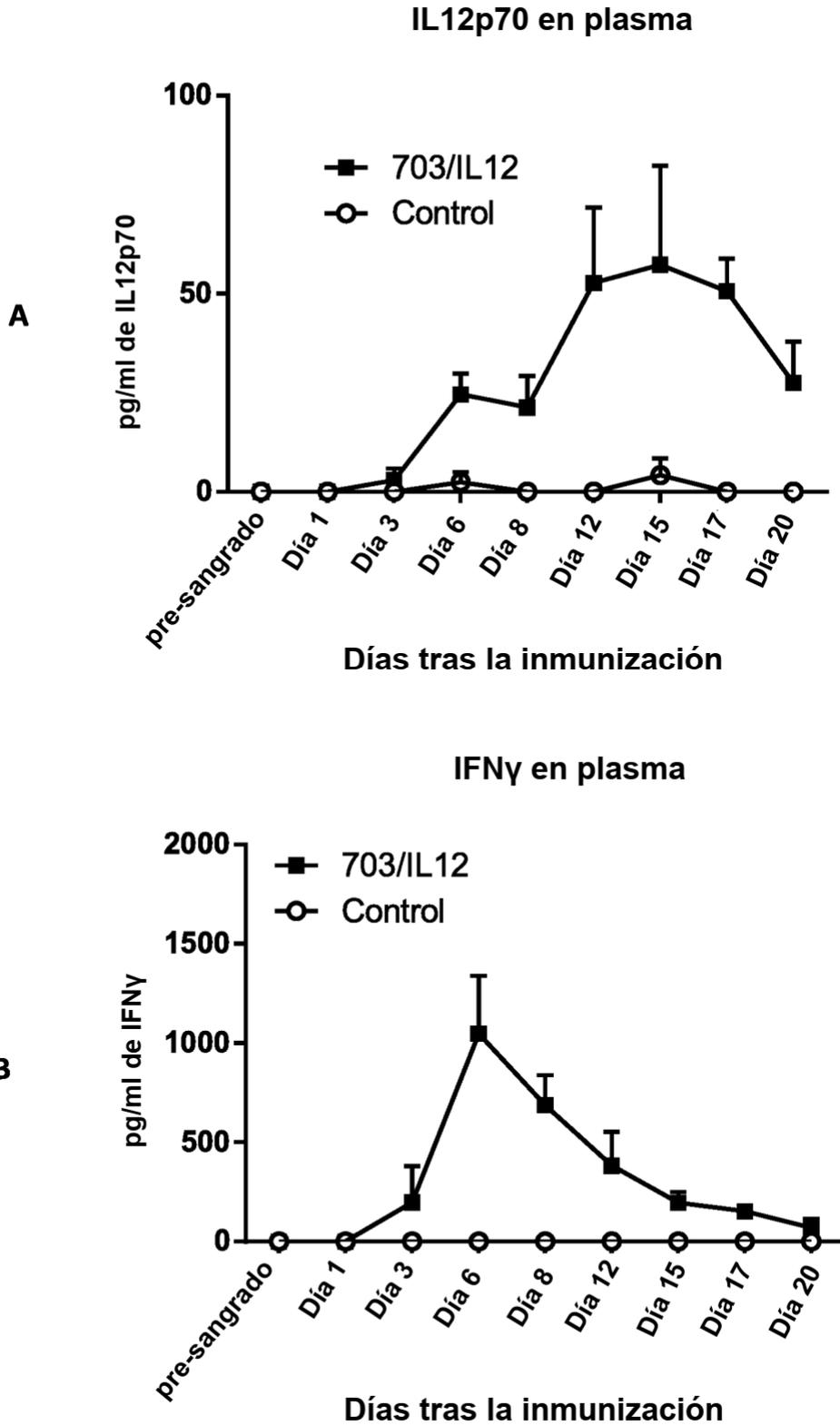


Figura 21

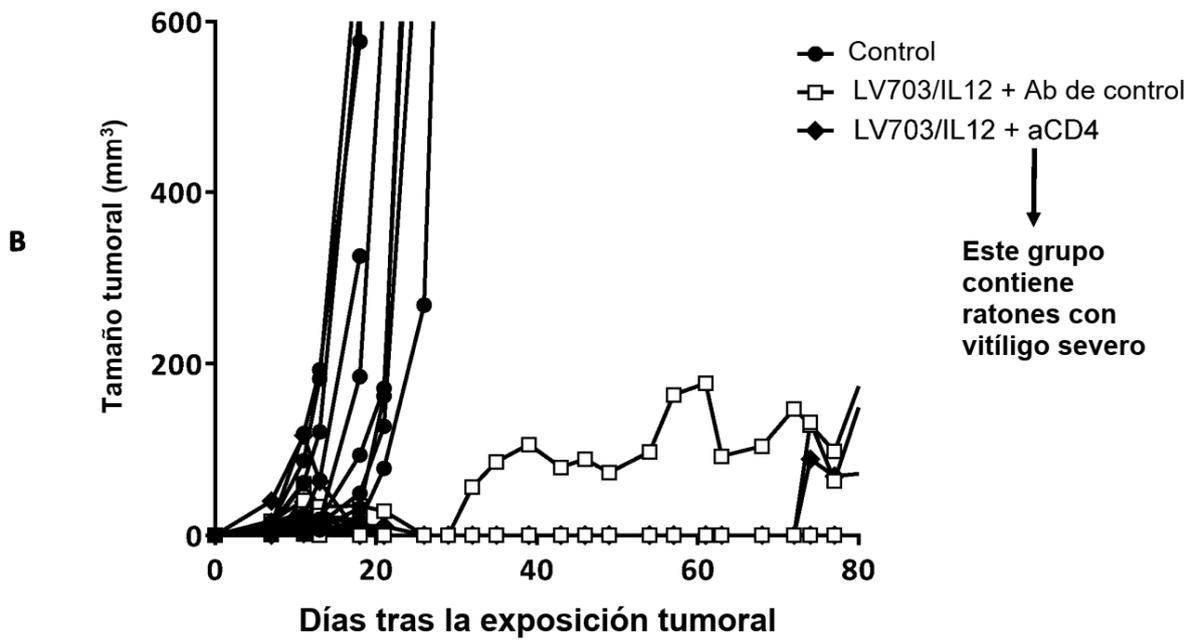
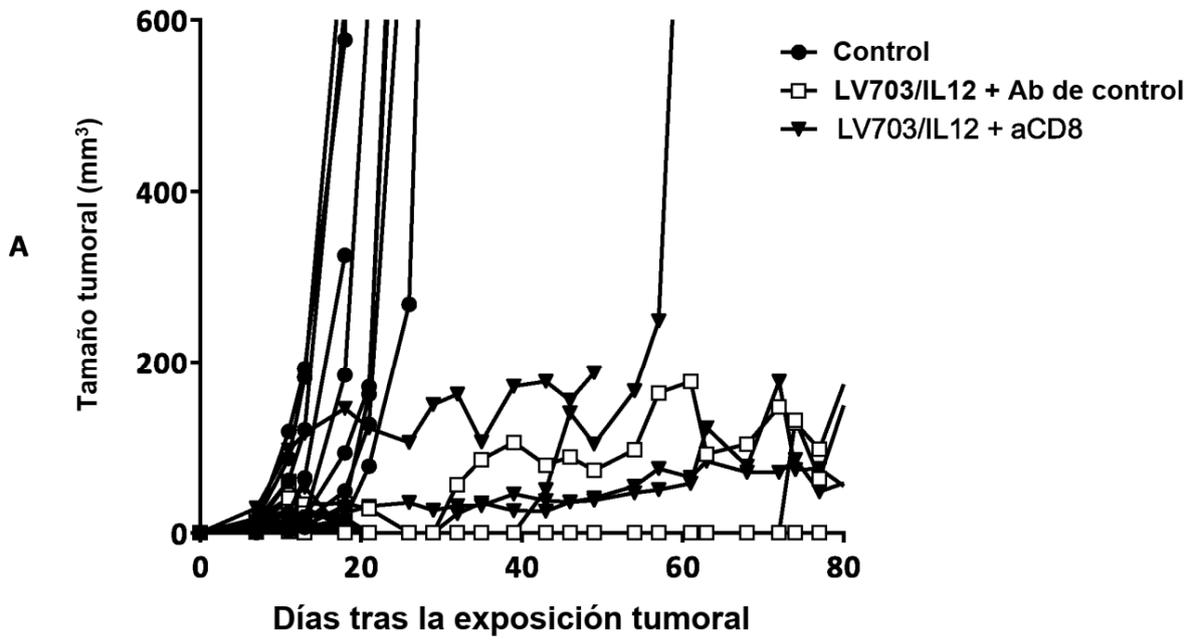


Figura 21

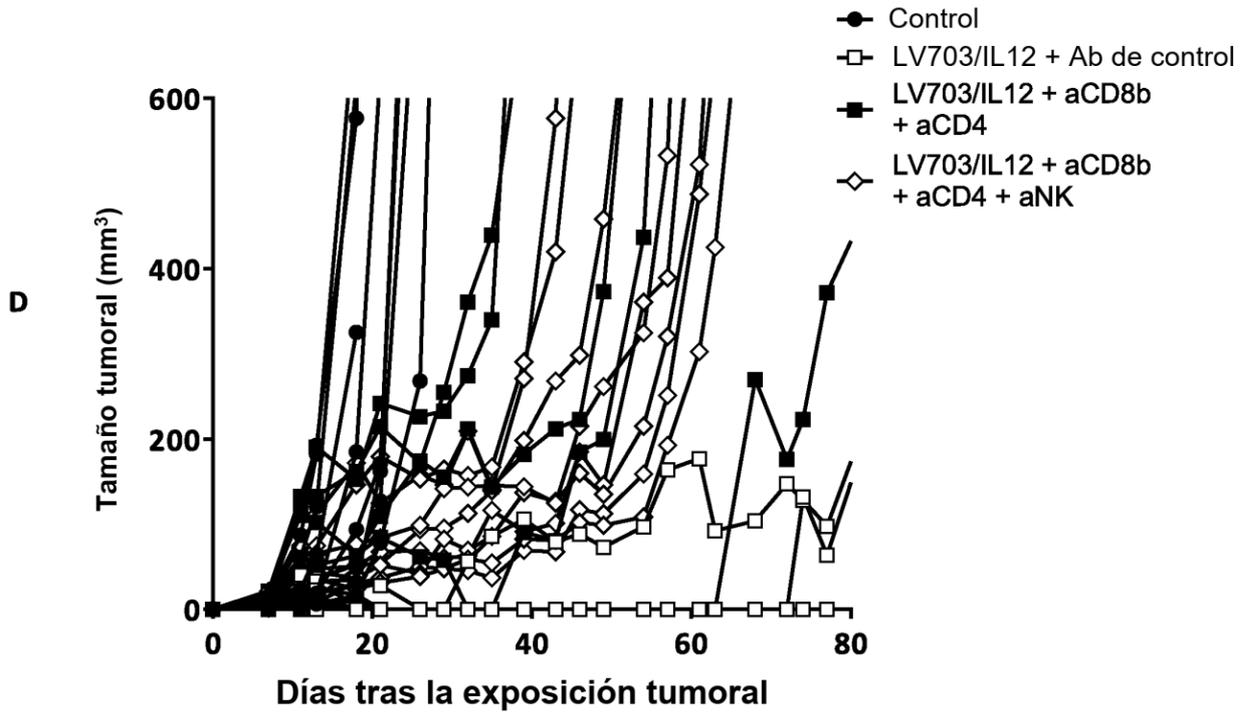
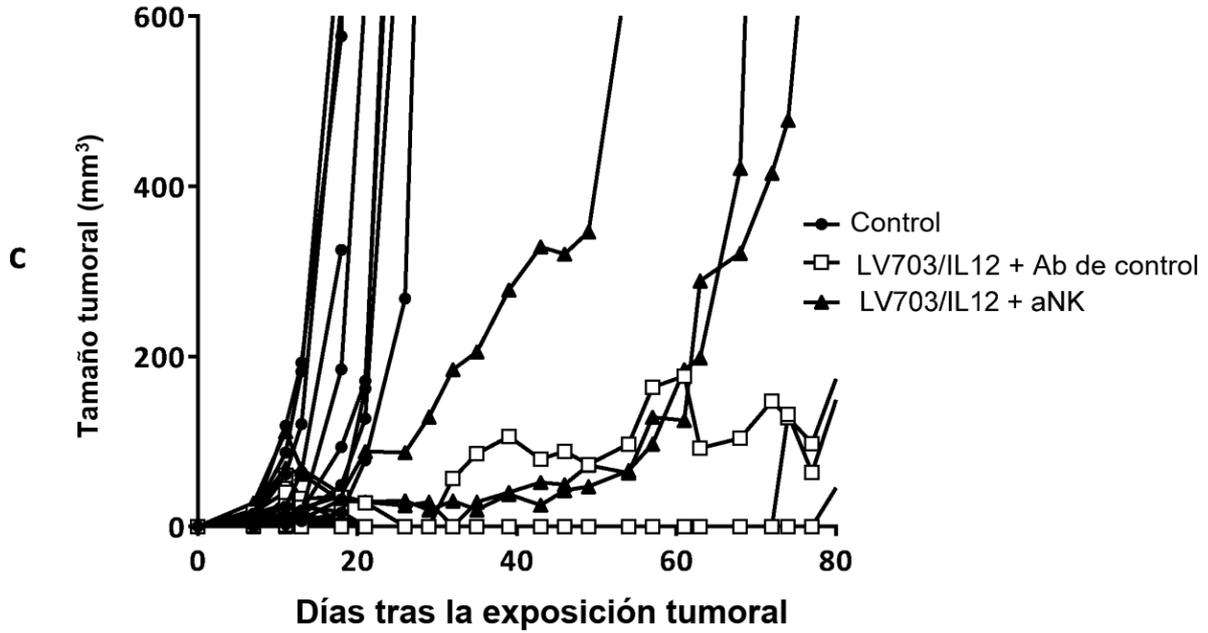


Figura 21

