

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 965 357**

(51) Int. Cl.:

**A61K 31/436** (2006.01)  
**A61K 31/4412** (2006.01)  
**C07K 14/705** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2008.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/573** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.01.2017 PCT/US2017/013399**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.07.2017 WO17123918**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2017 E 17739028 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2023 EP 3402483**

---

(54) Título: **Métodos y composiciones para la activación de linfocitos T gamma-delta**

(30) Prioridad:

**15.01.2016 US 201662279474 P**

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

**15.04.2024**

(73) Titular/es:

**AMERICAN GENE TECHNOLOGIES  
INTERNATIONAL INC. (100.0%)  
9713 Key West Ave., Fifth Floor  
Rockville, MD 20850, US**

(72) Inventor/es:

**PAUZA, CHARLES, DAVID;  
HAISHAN, LI;  
LAHUSEN, TYLER y  
LIOU, MEI-LING**

(74) Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 965 357 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**

Métodos y composiciones para la activación de linfocitos T gamma-delta

**5 Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere generalmente a los campos de la terapia génica y la inmunoterapia, específicamente en relación con un vector vírico que comprende al menos un elemento genético codificado, para su uso en el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa, en donde el al menos un elemento genético codificado comprende un ARN pequeño que, cuando se expresa, se dirige y reduce los niveles de expresión de farnesil difosfato sintasa (FDPS), en donde el ARN pequeño tiene una longitud de 200 nucleótidos o menos y posee una función silenciadora o de interferencia; una partícula lentivírica capaz de infectar una célula, para su uso en el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa, que comprende el vector vírico mencionado anteriormente, en donde el vector vírico es un vector lentivírico; un método *ex vivo* para activar un linfocito T gamma delta, comprendiendo el método infectar, en presencia del linfocito T GD, una célula diana con un sistema de suministro vírico que codifica al menos un elemento genético, en donde el al menos un elemento genético codificado comprende un ARN pequeño que, cuando se expresa, se dirige y reduce los niveles de expresión de farnesil difosfato sintasa (FDPS), en donde el ARN pequeño tiene una longitud de 200 nucleótidos o menos y posee una función silenciadora o de interferencia, y en donde, cuando la enzima se inhibe en la célula diana, la célula diana activa el linfocito T GD; y un sistema de suministro vírico para el mismo.

**20 Antecedentes**

Los linfocitos T humanos se distinguen en función de la estructura del receptor de linfocitos T. Las poblaciones principales, incluyendo los subconjuntos CD4+ y CD8+, expresan un receptor compuesto de cadenas alfa y beta. Un subconjunto más pequeño expresa receptores de linfocitos T formados por cadenas gamma y delta. Los linfocitos T gamma delta ("GD") constituyen el 3-10 % de los linfocitos circulantes, y el subconjunto V $\delta$ 2+ constituye el 75 % de los linfocitos T GD en la sangre. Las células V $\delta$ 2+ reconocen epítopos no peptídicos y no requieren la presentación del antígeno mediante complejos mayores de histocompatibilidad ("MHC") o antígeno leucocitario humano ("HLA"). La mayoría de los linfocitos T V $\delta$ 2+ también expresan una cadena Y $\gamma$ 9 y se estimulan por la exposición a compuestos de pirofosfato de 5 carbonos que son intermediarios en las vías de síntesis de esterol/isoprenoide mevalonato y no mevalonato. La respuesta al pirofosfato de isopentenilo (5 carbonos) es universal entre los seres humanos sanos.

Otro subconjunto de linfocitos T GD, V $\delta$ 1+, constituye un porcentaje mucho menor de los linfocitos T que circulan en la sangre, pero las células V $\delta$ 1+ se encuentran comúnmente en la mucosa epitelial y la piel.

En general, los linfocitos T GD tienen varias funciones, incluida la destrucción de células tumorales y células infectadas por patógenos. La estimulación a través de su exclusivo receptor de linfocitos T ("TCR") compuesto por dos cadenas de glucoproteínas,  $\gamma$  y  $\delta$ , mejora la capacidad de citotoxicidad celular, secreción de citocinas y otras funciones efectoras. Los TCR de los linfocitos T GD tienen especificidades únicas y las propias células se presentan en altas frecuencias clonales, lo que permite respuestas rápidas de tipo innato a tumores y patógenos.

Se han usado fármacos de aminobisfosfonatos ("ABP") y otros inhibidores de la farnesil difosfato sintasa ("FDPS"), que se encuentran cadena abajo del pirofosfato de isopentenilo ("IPP") en la vía del mevalonato (véase, por ejemplo, la figura 1) para tratar diversas enfermedades, incluyendo cánceres, específicamente aquellos que implican metástasis óseas. Los ABP incluyen nombres comerciales como Zometa® (Novartis) y Fosamax® (Merck).

También se han usado ABP para estimular los linfocitos T GD. Esto puede deberse a que cuando se inhibe la FDPS en las células mieloides, IPP comienza a acumularse y se reduce el pirofosfato de geranilgeranilo ("GGPP"), un producto cadena abajo de la FDPS que suprime la activación de la vía del inflamasoma. La reducción de GGPP elimina un inhibidor de la vía del inflamasoma dependiente de caspasa y permite la secreción de citocinas maduras, incluidas la interleucina beta y la interleucina 18, siendo esta última especialmente importante para la activación de los linfocitos T gamma delta.

Por lo tanto, cuando se bloquea la FDPS, el aumento de IPP y la disminución de GGPP se combinan para activar los linfocitos T V $\delta$ 2+. Las células V $\delta$ 2+ activadas por IPP o ABP proliferarán rápidamente, expresarán varias citocinas y quimiocinas, y pueden funcionar para destruir citotóxicamente células tumorales o células infectadas con microorganismos patógenos.

Sin embargo, los ABP están asociados con inflamación y osteonecrosis, además de tener una biodisponibilidad deficiente debido a su química. De forma análoga, IPP tiene una semivida muy corta y es difícil de sintetizar. Ambos tipos de compuestos requieren administración sistémica en un individuo. Por consiguiente, tanto los ABP en general como IPP específicamente, dejan mucho que desear con fines terapéuticos.

**Sumario de la invención**

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjuntas. En un aspecto, se proporciona un método *ex vivo*

# ES 2 965 357 T3

para activar un linfocito T GD. El método incluye infectar, en presencia del linfocito T GD, una célula diana con un sistema de suministro vírico que codifica al menos un elemento genético, en donde el al menos un elemento genético codificado comprende un ARN pequeño que, cuando se expresa, se dirige y reduce los niveles de expresión de farnesil difosfato sintasa (FDPS), en donde el ARN pequeño tiene una longitud de 200 nucleótidos o menos y posee una función silenciadora o de interferencia, y en donde, cuando la enzima se inhibe en la célula diana, la célula diana activa el linfocito T GD. En una realización, el al menos un elemento genético codificado puede comprender un microARN o un ARNh; preferentemente el ARNh puede comprender una secuencia que tiene al menos un 80 %, o al menos un 85 %, o al menos un 90 %, o al menos un 95 % de identidad con:

10 a.

GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGG  
ACTTTTT (SEQ ID NO: 1);

15 b.

GCAGGATTTCGTTCAGCACTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCT  
GCTTTTT (SEQ ID NO: 2);

c.

GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATT CCTGCCATGTACATG  
GCTTTTT (SEQ ID NO: 3); o

d.

GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCT  
GCTTTTT (SEQ ID NO: 4);

25 preferentemente el microARN puede comprender una secuencia que tiene al menos un 80 %, o al menos un 85 %, o al menos un 90 %, o al menos un 95 % de identidad con:

30 a.

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTC  
TGCCTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCC  
T ACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO: 5);

b.

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTC  
TGCCTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCC  
T AC TGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO: 6);

c.

TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTCTCAGCCTCCTCTCGTGAAGCC  
ACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTTGCCTACTGCCCTCGGA  
(SEQ ID NO: 7);

40 d.

CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTCTCAGCCTCCTC  
TGCTTTGCCACTGACTGAGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCAGGAC  
ACAAGGCCTGTTACTAGCACTCA (SEQ ID NO: 8);

e.

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTGGGACTTCTCAGCCTCCTC  
 T  
 GCCTGTTGAATCTCATGGCAGAAGGAGGCAGAAAGTCTGACATT  
 5 TGGTATCTTCATCTGACCA (SEQ ID NO: 9); o

f.

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTCTCAGCCTCCT  
 CTGCTGGTCCCCTCCCCGAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTCCCT  
 10 C CCAATGACCGCGTCTCGTCG (SEQ ID NO: 10).

10 En las realizaciones, la célula diana puede ser una célula cancerosa o una célula que ha sido infectada con un agente infeccioso. En una realización preferida, la activación del linfocito T GD puede dar como resultado que el linfocito T GD destruya la célula cancerosa o la célula infectada con un agente infeccioso. En las realizaciones, el al menos un elemento genético codificado puede incluir un microARN o un ARNh. En realizaciones adicionales, la célula diana 15 también se puede poner en contacto con un fármaco de aminobisfosfonato. En las realizaciones, el fármaco de aminobisfosfonato puede ser ácido zoledrónico.

20 En otra realización, se proporciona un vector vírico para su uso en el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa. Específicamente, en el presente documento se proporciona un vector vírico que comprende al menos un elemento genético codificado, para su uso en el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa, en donde el al menos un elemento genético codificado comprende un ARN pequeño que, cuando se expresa, se dirige y reduce los niveles de expresión de farnesil difosfato sintasa (FDPS), en donde el ARN pequeño tiene una longitud de 200 nucleótidos o menos y posee una función silenciadora o de interferencia. En las realizaciones, el vector vírico 25 puede usarse para inhibir la expresión de FDPS en una célula diana. En las realizaciones, la célula diana puede ser una célula cancerosa o una célula que ha sido infectada con una enfermedad infecciosa. En las realizaciones, cuando la enzima se inhibe en una célula cancerosa o una célula que ha sido infectada con una enfermedad infecciosa en presencia de un linfocito T GD, la célula cancerosa o la célula que ha sido infectada con una enfermedad infecciosa activa el linfocito T GD, para tratar así el cáncer o la enfermedad infecciosa. En las realizaciones, el al menos un elemento genético codificado puede incluir un microARN o un ARNh. En realizaciones adicionales, la célula diana 30 también se puede poner en contacto con un fármaco de aminobisfosfonato. En las realizaciones, el fármaco de aminobisfosfonato puede ser ácido zoledrónico.

En otra realización, el al menos un elemento genético codificado puede incluir un ARNh que tiene al menos un 80 %, o al menos un 85 %, o al menos un 90 %, o al menos un 95 % de porcentaje de identidad con

35 GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTT  
 (SEQ ID NO: 1); GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAA  
 ATCCTGCTTTT (SEQ ID NO: 2); GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAA  
 TTCCTGCCATGTACATGGCTTTT (SEQ ID NO: 3); o GCAGAAGGAGGCTGA  
 GAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT (SEQ ID NO: 4).

En una realización preferida, el ARNh puede incluir

40 GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTT  
 (SEQ ID NO: 1);  
 GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTT  
 (SEQ ID NO: 2);  
 GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCTGCCATGTACATGGCTTTT  
 (SEQ ID NO: 3);

45

GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT  
 (SEQ ID NO: 4).

- En otra realización, el al menos un elemento genético codificado incluye un microARN que tiene al menos un 80 %, o al menos un 85 %, o al menos un 90 %, o al menos un 95 % de porcentaje de identidad con la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; o SEQ ID NO: 4. En una realización preferida, el microARN incluye la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; o SEQ ID NO: 4.
- 5 AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAA  
 GCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAGGGCT (SEQ ID NO: 5);  
 AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAA  
 TTCTCAGCCTCCTCTGCGTAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCT  
 GCCTACTGCCTCGGACTTCAGGGCT (SEQ ID NO: 6); TGCTGTTGACAGTG  
 10 AGCGACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTAAGGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCT  
 AGAAAGTTGCCTACTGCCTCGGA (SEQ ID NO: 7); CCTGGAGGCTTGCTGAAG  
 GCTGTATGCTGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTGGCCACTGACTGAGCAGAAG  
 GGCTGAGAAAGTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCA (SEQ ID NO: 8);  
 CATCTCATGGCTGTACACCCTGTCGGGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTGTTG  
 15 AATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATTGGTATCTTCATCTGACCCA (SEQ ID NO: 9); o  
 GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTTCT  
 CAGCCTCCTCTGCTGGTCCCCCTCCCCGAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTTCCC  
 TCCCAATGACCGCGCTTCGTCG (SEQ ID NO: 10). En una realización preferida, el microARN incluye  
 AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCT  
 20 CCTTCTGCGTAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCACT  
 GCCTCGGACTTCAGGGCT (SEQ ID NO: 5); AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCT  
 AGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAGGGCT (SEQ ID NO: 6); TGCTG  
 TTGACAGTGAGCGACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTAAGGCCACAGATGGCAGAA  
 25 GGAGGCTGAGAAAGTGCCTACTGCCTCGGA (SEQ ID NO: 7); CCTGGAGGCT  
 TGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTGGCCACTGACTG  
 AGCAGAAGGCTGAGAAAGTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCA (SEQ ID NO: 8);  
 CATCTCATGGCTGTACACCCTGTCGGGACTTCTCAGCCTCCT  
 CTGCCTGTTGAATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATTGGTATCTTCATCTGACCA (SEQ ID  
 30 NO: 9); o GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGG  
 ATACTTCTCAGCCTCCTCTGCTGGTCCCCCTCCCCGAGAAGGAGGCTGAGAAA  
 GTCCCTCCCTCCCAATGACCGCGCTTCGTCG (SEQ ID NO: 10).
- En otro aspecto, se proporciona un vector vírico que comprende al menos un elemento genético codificado. En una realización, el al menos un elemento genético codificado puede incluir un ARN pequeño capaz de inhibir la producción de una enzima implicada en la vía del mevalonato. En otra realización, el al menos un elemento genético codificado puede incluir un microARN o un ARNh.
- 35 En otra realización, el al menos un elemento genético codificado puede incluir un ARNh que tiene al menos un 80 %, o al menos un 85 %, o al menos un 90 %, o al menos un 95 % de porcentaje de identidad con la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; o SEQ ID NO: 4. En una realización preferida, el ARNh puede incluir la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; o SEQ ID NO: 4.
- 40 En otra realización, el al menos un elemento genético codificado puede incluir un microARN que tiene al menos un 80 %, o al menos un 85 %, o al menos un 90 %, o al menos un 95 % de porcentaje de identidad con la SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; o SEQ ID NO: 10. En una realización preferida, el microARN puede incluir la SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; o SEQ ID NO: 10.
- 45 En las realizaciones, el vector vírico puede estar compuesto por cualquier vector que pueda transducir eficazmente el ARN pequeño en una célula diana. En las realizaciones, el vector vírico puede ser un vector lentivírico. En otras realizaciones, el vector vírico puede ser un vector vírico adenoasociado.
- 50 En otra realización, el vector vírico puede incluir un segundo elemento genético codificado. En las realizaciones, el segundo elemento genético puede incluir al menos una citocina o quimiocina. En las realizaciones, la al menos una citocina se selecciona del grupo que consiste en: IL-18, TNF- $\alpha$ , interferón- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-15, IL-17 e IL-12. En las realizaciones, la al menos una quimiocina puede ser una quimiocina CC, una quimiocina CXC, una quimiocina CX3C o una quimiocina XC. En realizaciones adicionales, la al menos una quimiocina puede ser RANTES.
- 55 En otra realización, se proporciona una partícula lantivírica capaz de infectar una célula, para su uso en el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa, comprendiendo la partícula lantivírica una proteína de envoltura optimizada para infectar una célula diana, y un vector lantivírico que es el vector vírico de la invención. En una realización, la proteína de envoltura puede optimizarse para infectar una célula diana, y la célula diana es una célula cancerosa o en donde la célula diana puede ser una célula que está infectada con una enfermedad infecciosa.

En otra realización, se proporciona un sistema de suministro vírico que codifica al menos un elemento genético, en donde el al menos un elemento genético codificado comprende un ARN pequeño que, cuando se expresa, se dirige y reduce los niveles de expresión de farnesil difosfato sintasa (FDPS), en donde el ARN pequeño tiene una longitud de 200 nucleótidos o menos y posee una función silenciadora o de interferencia, para su uso en la activación de un linfocito T GD en un sujeto, en donde, en presencia del linfocito T GD, cuando la célula diana en el sujeto está infectada con el sistema de suministro vírico, y la enzima se inhibe en la célula diana, la célula diana activa el linfocito T GD. También se proporciona en el presente documento un sistema de suministro vírico que codifica al menos un elemento genético, en donde el al menos un elemento genético codificado comprende un ARN pequeño que, cuando se expresa, se dirige y reduce los niveles de expresión de farnesil difosfato sintasa (FDPS), en donde el ARN pequeño tiene una longitud de 200 nucleótidos o menos y posee una función silenciadora o de interferencia, para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, y en donde, cuando la enzima se inhibe en una célula cancerosa en presencia de un linfocito T GD, la célula cancerosa activa el linfocito T GD, para así tratar el cáncer. El sistema de suministro vírico puede comprender además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco de aminobisfosfonato.

En una realización preferida, el fármaco de aminobisfosfonato puede ser ácido zoledrónico.

En otro aspecto como se divulga en el presente documento, se proporciona un sistema de vector lentivírico para expresar una partícula lentivírica. El sistema incluye un vector lentivírico, al menos un plásmido de envoltura para expresar una proteína de envoltura optimizada para infectar una célula; y al menos un plásmido auxiliar para expresar genes gag, pol y rev. Cuando el vector lentivírico, el al menos un plásmido de envoltura, y el al menos un plásmido auxiliar, se transfectan en una célula de empaquetamiento, una célula de empaquetamiento produce una partícula lentivírica. En los aspectos como se divulga en el presente documento, la partícula lentivírica es capaz de infectar una célula diana e inhibir una enzima implicada en la vía del mevalonato dentro de la célula diana. En los aspectos como se divulga en el presente documento, la enzima involucrada en la vía del mevalonato es FDPS. En los aspectos como se divulga en el presente documento, el sistema vectorial lentivírico incluye un primer plásmido auxiliar para expresar los genes gag y pol, y un segundo plásmido auxiliar para expresar el gen rev. En los aspectos como se divulga en el presente documento, la proteína de envoltura está preferentemente optimizada para infectar una célula diana. En los aspectos como se divulga en el presente documento, la célula diana es una célula cancerosa. En otros aspectos como se divulga en el presente documento, la célula diana es una célula que está infectada con un agente infeccioso.

#### Breve descripción de los dibujos

La **figura 1** representa una descripción general de las etapas principales en la vía del mevalonato para la biosíntesis de esteroides e isoprenoides.

La **figura 2** representa un sistema vectorial lentivírico de 3 vectores ilustrativo de forma circularizada.

La **figura 3** representa un sistema vectorial lentivírico de 4 vectores ilustrativo de forma circularizada.

La **figura 4** representa: (A) un mapa lineal de un vector lentivírico que expresa una secuencia dirigida a ARNhC de FDPS; y (B) un mapa lineal de un vector lentivírico que expresa un microARN sintético con una secuencia dirigida a FDPS.

La **figura 5** representa datos que demuestran la activación de linfocitos T V $\delta$ 2+ por células leucémicas THP-1 con un lentivirus que expresa ARNhC n.º 4 de FDPS (SEQ ID NO: 4), como se describe en el presente documento.

La **figura 6** representa datos que demuestran la activación de linfocitos T V $\delta$ 2+ por células leucémicas THP-1 con un lentivirus que expresa ARNhC n.º 4 de FDPS (SEQ ID NO: 4), como se describe en el presente documento.

La **figura 7** representa datos que demuestran la activación de linfocitos T V $\delta$ 2+ por células de carcinoma de próstata PC3 con un lentivirus que expresa ARNhC n.º 1 de FDPS (SEQ ID NO: 1), como se describe en el presente documento.

La **figura 8** representa datos que demuestran la activación de linfocitos T V $\delta$ 2+ por células de carcinoma de próstata PC3 con un lentivirus que expresa ARNhC n.º 4 de FDPS (SEQ ID NO: 4), como se describe en el presente documento.

La **figura 9** representa datos que demuestran la activación de linfocitos T V $\delta$ 2+ por células de carcinoma HepG2 con un lentivirus que expresa ARNhC n.º 1 de FDPS (SEQ ID NO: 1) o ARNhC n.º 4 de FDPS (SEQ ID NO: 4), como se describe en el presente documento.

La **figura 10** representa datos que demuestran la activación de linfocitos T V $\delta$ 2+ por células de leucemia THP-1 con un lentivirus que expresa miR30 n.º 1 de FDPS (SEQ ID NO: 5), como se describe en el presente documento.

La **figura 11** representa datos que demuestran el porcentaje de lisis específica frente a una relación E:D para una diversidad de condiciones experimentales, como se describe en el presente documento.

La **figura 12** representa datos que demuestran la interferencia de ARN a base de ARNhC suministrado por lentivirus dirigida al gen FDPS humano.

La **figura 13** representa datos que demuestran la interferencia de ARN a base de miR suministrado por lentivirus dirigida al gen FDPS humano.

La **figura 14** representa datos que demuestran la activación de linfocitos T V $\delta$ 2+ por células de carcinoma HepG2 con un virus adenoasociado que expresa ARNhC n.º 4 de FDPS (SEQ ID NO: 4), como se describe en el presente documento.

La **figura 15** representa datos de inmunotransferencia que demuestran la falta de prenilación de RAP1 en las células transducidas con LV-shFDPS y tratadas con ácido zoledrónico.

**Descripción detallada****Descripción general de la divulgación**

- 5 La presente divulgación se refiere a construcciones de terapia génica y al suministro de las mismas a las células, dando como resultado la supresión de la farnesil difosfato sintasa ("FDPS"), que es necesaria para convertir el fosfato de isopentenilo (IPP) en difosfato de farnesilo (FDP), como se muestra, por ejemplo, en la figura 1. En los aspectos, se divultan en el presente documento uno o más vectores víricos con microARN o ARN de homología corta (ARNhc) que se dirigen a FDPS, reduciendo así los niveles de expresión de esta enzima. Los vectores víricos incluyen vectores 10 lentivíricos y vectores AAV. Una consecuencia de modular la expresión de FDPS es aumentar la acumulación de IPP, que es un estimulador de la proliferación y diferenciación de linfocitos T GD. Por consiguiente, las construcciones proporcionadas en el presente documento se usan para activar linfocitos T GD y se usan para tratar cánceres y enfermedades infecciosas.

**15 Definiciones e interpretación**

A menos que se defina de otro modo en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente divulgación, tendrán los significados habitualmente entendidos por los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán pluralidades y los términos en plural 20 incluirán el singular. Generalmente, la nomenclatura usada en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridación que se describen en el presente documento son las ya conocidas y usadas frecuentemente en la técnica. A menos que se indique lo contrario, los métodos y las técnicas de la presente divulgación se realizan generalmente de acuerdo con 25 métodos convencionales de sobra conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véanse, por ejemplo: Sambrook J. y Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current 30 Protocols in Molecular Biology, Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); y Coligan *et al.*, Short Protocols in Protein Science, Wiley, John & Sons, Inc. (2003). Todas las reacciones enzimáticas o las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se realizan comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. La nomenclatura usada en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de la química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica que se describen en el 35 presente documento se conocen bien y se usan comúnmente en la técnica.

Como se usa en la descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la", se usan 40 indistintamente y pretenden incluir también las formas en plural e incluirse en cada significado, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, como se usa en el presente documento, "y/o" se refiere a, e incluye, todas y cada una de las combinaciones posibles de uno o más de los puntos enumerados, así como la ausencia de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa "o".

Todas las designaciones numéricas, por ejemplo, el pH, la temperatura, el tiempo, la concentración y el peso 45 molecular, incluyendo los intervalos, son aproximaciones que varían (+) o (-) en incrementos de 0,1. Debe entenderse, aunque no siempre se indique explícitamente, que todas las designaciones numéricas están precedidas por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" también incluye el valor exacto "X" además de incrementos minoritarios de "X", tales como "X + 0,1" o "X - 0,1". También se ha de entender, aunque no siempre se indique explícitamente, que los reactivos descritos en el presente documento son simplemente ilustrativos y que en la técnica se conocen sus equivalentes.

50 Como se usa en el presente documento, un experto en la técnica entenderá el término "aproximadamente" y este variará hasta cierto punto dependiendo del contexto en el que se use. Si hay usos del término que no estén claros para un experto en la técnica, dado el contexto en el que se use, "aproximadamente" significará hasta más o menos el 10 % del término particular.

55 Debe entenderse que la expresión "administración de" o el término "administrar" un agente activo, significan proporcionar un agente activo al sujeto que necesita tratamiento en una forma que pueda introducirse en el organismo de ese individuo en una forma terapéuticamente útil y en una cantidad terapéuticamente eficaz.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "que comprende" pretende significar que las composiciones y los métodos incluyen los elementos citados, pero sin excluir otros. "Que consiste esencialmente en" cuando se usa para definir las composiciones y los métodos, significará excluir de la composición o métodos otros elementos de cualquier significado esencial. "Que consistente en" significará la exclusión de más que oligoelementos de otros ingredientes para las composiciones reivindicadas y las etapas sustanciales del método. Las realizaciones definidas por cada uno de estos términos de transición están dentro del alcance de esta divulgación. Por consiguiente, se pretende que los métodos y las composiciones puedan incluir etapas y componentes adicionales (que comprendan) o, como alternativa, que incluyan etapas y composiciones poco significativos (que consistan esencialmente en) o como 65

alternativa, que incluyan únicamente las etapas o composiciones del método indicados (que consistan en).

Como se usan en el presente documento, "expresión", "expresado", o "codifica", se refiere al proceso mediante el cual los polinucleótidos se transcriben en ARNm y/o el proceso mediante el cual el ARNm transcrit se traduce posteriormente en péptidos, polipéptidos o proteínas. La expresión puede incluir el corte y empalme del ARNm en una célula eucariota u otras formas de modificación postranscripcional o modificación posttraduccional.

En el presente documento, la expresión "farnesil difosfato sintasa" también puede indicarse como FDPS, y también puede indicarse como farnesil pirofosfato sintasa o FPPS.

En el presente documento, la expresión "linfocito T gamma delta" también puede indicarse como linfocito T γδ, o además como linfocito T GD. La expresión "activación de linfocitos T gamma delta" se refiere a cualquier fenómeno biológico medible asociado a un linfocito T gamma delta que sea representativo de dicho linfocito T que se esté activando. Los ejemplos no limitantes de dicho fenómeno biológico incluyen un aumento de la producción de citocinas, cambios en la composición cualitativa o cuantitativa de las proteínas de la superficie celular, un aumento en la proliferación de linfocitos T y/o un aumento en la función efectora de los linfocitos T, como destruir una célula diana o ayudar a otra célula efectora a destruir una célula diana.

Los términos "individuo", "sujeto", y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a cualquier sujeto mamífero individual, por ejemplo, bovino, cánido, felino, equino o humano.

El término "miARN" se refiere a un microARN, y en el presente documento también puede indicarse como "miR".

La expresión "línea celular de empaquetamiento" se refiere a cualquier línea celular que pueda usarse para expresar una partícula lentivírica.

La expresión "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje específico de nucleótidos o de restos de aminoácidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para obtener una correspondencia máxima, según lo medido usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias que se describen a continuación (por ejemplo, BLASTP y BLASTN u otros algoritmos disponibles para los expertos) o mediante inspección visual. Dependiendo de la aplicación, el "porcentaje de identidad" puede existir sobre una región de la secuencia a comparar, por ejemplo, sobre un dominio funcional, o, como alternativa, puede existir sobre la longitud completa de las dos secuencias a comparar. Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Después, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia de la secuencia o secuencias de prueba respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

Para la comparación, la alineación óptima de las secuencias puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete del programa informático Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección visual (véase, en líneas generales, más adelante, Ausubel *et al.*).

Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). El programa informático para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el programa GAP en el paquete de programa informático GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y una ponderación por hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y una ponderación por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. También se puede determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de ponderación de restos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de programa informático GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250 y una ponderación por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una ponderación por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Las secuencias de ácido nucleicos y de proteínas de la presente divulgación se pueden usar además como una

"secuencia de consulta" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden realizarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Con el programa NBLAST, pueden realizarse búsquedas BLAST de nucleótidos, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en la divulgación. Las búsquedas de proteínas por BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteínas de la divulgación. Para obtener alineamientos con huecos con fines comparativos, se puede usar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Como se usa en el presente documento, "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos, órganos y/o fluidos corporales de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones en línea con una relación entre beneficio/riesgo razonable.

Como se usa en el presente documento, un "transportador farmacéuticamente aceptable" se refiere a, e incluye, todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Las composiciones pueden incluir una sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, una sal de adición de ácido o una sal de adición de base (véase, por ejemplo, Berge *et al.* (1977) J Pharm Sci 66: 1-19).

Como se usa en el presente documento, la expresión "SEQ ID NO" es sinónima de "Secuencia ID No".

Como se usa en el presente documento, "ARN pequeño" se refiere a ARN no codificante que generalmente tiene una longitud de menos de aproximadamente 200 nucleótidos o menos y posee una función de silenciamiento o de interferencia. En otras realizaciones, el ARN pequeño tiene aproximadamente 175 nucleótidos o menos, aproximadamente 150 nucleótidos o menos, aproximadamente 125 nucleótidos o menos, aproximadamente 100 nucleótidos o menos, o aproximadamente 75 nucleótidos o menos de longitud. Dichos ARN incluyen microARN (miARN), ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN bicatenario (ARNbc) y ARN en horquilla corto (ARNhc). El "ARN pequeño" de la divulgación debe ser capaz de inhibir o atenuar la expresión génica de un gen diana, generalmente a través de vías que dan como resultado la destrucción del ARNm del gen diana.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente de los agentes activos de la presente divulgación, en una composición adecuada y en una forma farmacéutica adecuada para tratar o prevenir los síntomas, el avance o la aparición de las complicaciones observadas en pacientes que padecen una determinada dolencia, lesión, enfermedad o afección. La cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del estado de la afección del paciente o de su gravedad, y de la edad, el peso, *etc.*, del sujeto que se va a tratar. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede variar, dependiendo de cualquiera de diversos factores, incluyendo, por ejemplo, la vía de administración, el estado del sujeto, así como de otros factores entendidos por los expertos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vector terapéutico" incluye, sin limitación, la referencia a un vector lentivírico o un vector AAV.

"Un tratamiento" pretende dirigirse al cuadro clínico y combatirlo, es decir, mejorar o impedir el cuadro clínico. Por lo tanto, el tratamiento particular dependerá del cuadro clínico al que se dirige y del estado actual o futuro de las terapias médicas y enfoques terapéuticos. Un tratamiento puede tener toxicidades asociadas.

El término "tratamiento" o "tratar" se refiere a una intervención clínica en un intento de alterar la evolución natural del sujeto que se esté tratando y puede realizarse para profilaxis o durante la evolución de la patología clínica. Los efectos deseables incluyen, pero sin limitación, prevenir la aparición o recidiva de la enfermedad, el alivio de los síntomas, la supresión, la disminución o inhibición de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, mejorar o paliar el cuadro clínico y causar remisión o mejorar el pronóstico.

#### **55 Descripción de aspectos de la divulgación**

En una realización, se proporciona un método *ex vivo* para activar un linfocito T gamma delta, comprendiendo el método infectar, en presencia del linfocito T GD, una célula diana con un sistema de suministro vírico que codifica al menos un elemento genético, en donde el al menos un elemento genético codificado comprende un ARN pequeño que, cuando se expresa, se dirige y reduce los niveles de expresión de farnesil difosfato sintasa (FDPS), en donde el ARN pequeño tiene una longitud de 200 nucleótidos o menos y posee una función silenciadora o de interferencia, y en donde, cuando la enzima se inhibe en la célula diana, la célula diana activa el linfocito T GD. En las realizaciones, la célula diana es una célula cancerosa o una célula que ha sido infectada con un agente infeccioso. En las realizaciones, el al menos un elemento genético codificado incluye un microARN o un ARNhC.

En las realizaciones, el al menos un elemento genético codificado incluye un ARNhc que tiene al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 % o más de porcentaje de identidad con

5 GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAAATGGCATTGACTCCAGGACTTTT (SEQ ID NO: 1);  
 GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAAGTGCTGAACGAA ATCCTGCTTTT (SEQ ID NO: 2);  
 GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAA TTCCCTGCCATGTACATGGCTTTT (SEQ ID NO: 3); o  
 GCAGAAGGAGGCTGA GAAAGTCTGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT (SEQ ID NO: 4). En una  
 10 realización preferida, el ARNhc incluye GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAG  
 AATGGCATTGTA CTCAGGACTTTT (SEQ ID NO: 1); GCAGGATTCGTTCA  
 15 GCACTTCTCGAGAAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTT (SEQ ID NO: 2); GCCA  
 TGTCATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCTGCCATGTACATGGCTTTT (SEQ ID NO: 3); o  
 GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTGAGACTTCTCAGCCTCCT CTGCTTTT (SEQ ID NO: 4).

15 En otra realización, el al menos un elemento genético codificado incluye un microARN que tiene al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 % o más de porcentaje de identidad con AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAA

20 GCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCA AGGGGCT (SEQ ID NO: 5);  
 AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACT  
 TTCTCAGCCTCCTTCTCGCGTAAGGCCACAGATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCT  
 25 GCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO: 6); TGCTGTTGACAGTG  
 AGCGACTTCTCAGCCTCCTTCTCGCGTAAGGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTG  
 AGAAAAGTTGCCTACTGCCTCGGA (SEQ ID NO: 7); CCTGGAGGCTTGCTGAAG  
 GCTGTATGCTGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTGGCCACTGACTGAGCAGAAG  
 GGCTGAGAAAGTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCA (SEQ ID NO: 8);  
 30 CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTGCGGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTGTTG  
 AATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATTTGGTATCTTCATCTGA CCA (SEQ ID NO: 9); o  
 GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCAGGGATACTTTCT  
 CAGCCTCCTCTGCTGGTCCCCTCCCCGAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTTCCC  
 35 TCCAATGACCGCGTCTCGTCG (SEQ ID NO: 10). En una realización preferida, el microARN incluye AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCT  
 CCTTCTGCGTAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACT  
 GCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO: 5); AAGGTATATTGCTGTTGACAGT  
 40 GAGCGACACTTCTCAGCCTCCTTCTCGCGTAAGGCCACAGATGGCAGAAGGGCTG  
 AGAAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO: 6); TGCTG  
 TTGACAGTGAGCGACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAGGCCACAGATGGCAGAA  
 GGAGGCTGAGAAAGTTGCCTACTGCCTCGGA (SEQ ID NO: 7); CCTGGAGGCT  
 45 TGCCTGCTGAGAAAGTGCTGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTGGCCACTGACTG  
 AGCAGAAGGGCTGAGAAAGTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGCACTCA (SEQ ID NO: 8);  
 CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTGCGGACTTCTCAGCCTCCTT  
 CTGCTGTTGAATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATTTGGTATC TTTCATCTGACCA (SEQ ID NO: 9); o  
 GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGG  
 50 45 ATACTTCTCAGCCTCCTCTGCTGGTCCCCTCCCCGAGAAGGAGGCTGAGAAA  
 GTCCCTCCCTCCCAATGACCGCGTCTCGTCG (SEQ ID NO: 10).

En otra realización, la célula diana también se pone en contacto con un fármaco de aminobisfosfonato. En una realización preferida, el fármaco de aminobisfosfonato es ácido zoledrónico.

50 En otra realización, se proporciona un sistema de suministro vírico que codifica al menos un elemento genético, en donde el al menos un elemento genético codificado comprende un ARN pequeño que, cuando se expresa, se dirige y reduce los niveles de expresión de farnesil difosfato sintasa (FDPS), en donde el ARN pequeño tiene una longitud de 200 nucleótidos o menos y posee una función silenciadora o de interferencia, para su uso en la activación de un linfocito T GD en un sujeto, en donde, en presencia del linfocito T GD, cuando la célula diana en el sujeto está infectada con el sistema de suministro vírico, y la enzima se inhibe en la célula diana, la célula diana activa el linfocito T GD. En otra realización más, se proporciona un sistema de suministro vírico que codifica al menos un elemento genético, en donde el al menos un elemento genético codificado comprende un ARN pequeño que, cuando se expresa, se dirige y reduce los niveles de expresión de farnesil difosfato sintasa (FDPS), en donde el ARN pequeño tiene una longitud de 200 nucleótidos o menos y posee una función silenciadora o de interferencia, para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, y en donde, cuando la enzima se inhibe en una célula cancerosa en presencia de un linfocito T GD, la célula cancerosa activa el linfocito T GD, para tratar así el cáncer. En las realizaciones, el al menos un elemento genético codificado incluye un microARN o un ARNhc. El sistema de suministro vírico puede comprender además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco de aminobisfosfonato. En una realización preferida, el fármaco de aminobisfosfonato puede ser ácido zoledrónico.

- En otra realización, el al menos un elemento genético codificado puede incluir un ARNhC que tiene al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 % o más de porcentaje de identidad con la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; o SEQ ID NO: 4. En una realización preferida, el ARNhC incluye la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; o SEQ ID NO: 4.
- En otra realización, el al menos un elemento genético codificado puede incluir un microARN que tiene al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 % o más de porcentaje de identidad con la SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; o SEQ ID NO: 10. En una realización preferida, el microARN incluye la SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; o SEQ ID NO: 10.
- En otra realización, se proporciona un vector vírico que comprende al menos un elemento genético codificado, para su uso en el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa, en donde el al menos un elemento genético codificado comprende un ARN pequeño que, cuando se expresa, se dirige y reduce los niveles de expresión de farnesil difosfato sintasa (FDPS), en donde el ARN pequeño tiene una longitud de 200 nucleótidos o menos y posee una función silenciadora o de interferencia. En las realizaciones, el vector vírico incluye cualquier vector que pueda transducir eficazmente el ARN pequeño. En las realizaciones, el vector vírico es un vector lentivírico. En otras realizaciones, el vector vírico es un vector vírico adenoasociado (AAV). En las realizaciones, al menos un elemento genético codificado puede incluir un microARN o un ARNhC.
- En otra realización, el al menos un elemento genético codificado puede incluir un ARNhC que tiene al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 % o más de porcentaje de identidad con la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; o SEQ ID NO: 4. En una realización preferida, el ARNhC incluye la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3; o SEQ ID NO: 4.
- En otra realización, el al menos un elemento genético codificado puede incluir un microARN que tiene al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 % o más de porcentaje de identidad con la SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; o SEQ ID NO: 10. En una realización preferida, el microARN incluye la SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; o SEQ ID NO: 10.
- En otra realización, el vector vírico puede incluir un segundo elemento genético codificado. En las realizaciones, el segundo elemento genético incluye al menos una citocina o quimiocina. En las realizaciones, la al menos una citocina se selecciona del grupo que consiste en: IL-18, TNF- $\alpha$ , interferón- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-15, IL-17 e IL-12. En las realizaciones, la al menos una quimiocina es una quimiocina CC, una quimiocina CXC, una quimiocina CX3C o una quimiocina XC. En una realización adicional, la al menos una quimiocina es la quimiocina CC, RANTES.
- En otra realización, se proporciona una partícula lentivírica capaz de infectar una célula, para su uso en el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa, comprendiendo la partícula lentivírica una proteína de envoltura optimizada para infectar una célula diana, y un vector lentivírico, que es el vector vírico de la invención. En las realizaciones, se proporciona un sistema de vector lentivírico para expresar una partícula lentivírica. El sistema incluye un vector lentivírico, al menos un plásmido de envoltura para expresar una proteína de envoltura optimizada para infectar una célula; y al menos un plásmido auxiliar para expresar genes gag, pol y rev. Cuando el vector lentivírico, el al menos un plásmido de envoltura, y el al menos un plásmido auxiliar, se transfecan en una célula de empaquetamiento, una célula de empaquetamiento produce una partícula lentivírica. En las realizaciones, la partícula lentivírica es capaz de infectar una célula diana e inhibir una enzima implicada en la vía del mevalonato dentro de la célula diana. En las realizaciones, la enzima involucrada en la vía del mevalonato es FDPS. En las realizaciones, el sistema vectorial lentivírico incluye un primer plásmido auxiliar para expresar los genes gag y pol, y un segundo plásmido auxiliar para expresar el gen rev. En las realizaciones, la proteína de envoltura está preferentemente optimizada para infectar una célula diana. En las realizaciones, la célula diana es una célula cancerosa. En otras realizaciones, la célula diana es una célula que está infectada con una enfermedad infecciosa.
- Cáncer**
- Se proporciona un vector vírico que comprende al menos un elemento genético codificado, para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el al menos un elemento genético codificado comprende un ARN pequeño que, cuando se expresa, se dirige y reduce los niveles de expresión de farnesil difosfato sintasa (FDPS), en donde el ARN pequeño tiene una longitud de 200 nucleótidos o menos y posee una función silenciadora o de interferencia. El vector vírico para su uso proporcionado en el presente documento puede usarse para tratar el cáncer. Una célula, tejido o diana puede ser una célula cancerosa, un tejido canceroso, albergar tejido canceroso, o ser un sujeto o paciente

diagnosticado o en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección. En determinadas realizaciones, una célula puede ser una célula epitelial, endotelial, mesotelial, glial, estromal o mucosa. La población de células cancerosas puede incluir, pero sin limitación, una célula cerebral, neuronal, sanguínea, endometrial, meníngea, esofágica, pulmonar, cardiovascular, hepática, linfoide, de mama, ósea, de tejido conectivo, grasa, retina, tiroidea, glandular, suprarrenal, 5 pancreática, de estómago, intestino, riñón, vejiga, colon, próstata, útero, ovario, cuello del útero, testículo, bazo, piel, músculo liso, músculo cardíaco o músculo estriado. En otra realización más, el cáncer incluye, pero sin limitación, astrocitoma, leucemia mieloide aguda, linfoma anaplásico de células grandes, leucemia linfoblástica aguda, angiosarcoma, linfoma de linfocitos B, linfoma de Burkitt, carcinoma de mama, carcinoma de vejiga, carcinoma de 10 cabeza y cuello, carcinoma cervicouterino, leucemia linfoblástica crónica, leucemia mieloide crónica, carcinoma colorectal, carcinoma de endometrio, carcinoma de células escamosas esofágicas, sarcoma de Ewing, fibrosarcoma, glioma, glioblastoma, gastrinoma, carcinoma gástrico, hepatoblastoma, carcinoma hepatocelular, sarcoma de Kaposi, linfoma de Hodgkin, carcinoma de células escamosas de laringe, carcinoma de laringe, leucemia, leiomirosarcoma, lipoma, liposarcoma, melanoma, linfoma de células del manto, meduloblastoma, mesotelioma, mixofibrosarcoma, 15 leucemia mieloide, linfoma de linfocitos B de tejido linfoide asociado a mucosas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico de alto riesgo, carcinoma nasofaríngeo, neuroblastoma, neurofibroma, linfoma no hodkiniano de alto grado, linfoma no hodgkiniano, carcinoma de pulmón, carcinoma pulmonar no microcítico, carcinoma de ovario, carcinoma de esófago, osteosarcoma, carcinoma pancreático, feocromocitoma, carcinoma de próstata, carcinoma de células renales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, tumor de glándulas salivales, schwannoma, cáncer de pulmón microcítico, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, tumor testicular, carcinoma de tiroides, carcinoma 20 urotelial y tumor de Wilm.

Las composiciones y métodos que se divultan en el presente documento también se usan para tratar NSCLC (cáncer de pulmón no microcítico), neoplasias malignas pediátricas, tumores cervicouterinos y otros tumores causados o promovidos por el virus del papiloma humano (HPV), melanoma, esófago de Barrett (síndrome premaligno), cánceres 25 suprarrenales y de piel y autoinmunitarios, enfermedades cutáneas neoplásicas.

### **Enfermedades infecciosas**

Se proporciona un vector vírico que comprende al menos un elemento genético codificado, para su uso en el 30 tratamiento de una enfermedad infecciosa, en donde el al menos un elemento genético codificado comprende un ARN pequeño que, cuando se expresa, se dirige y reduce los niveles de expresión de farnesil difosfato sintasa (FDPS), en donde el ARN pequeño tiene una longitud de 200 nucleótidos o menos y posee una función silenciadora o de interferencia. El vector vírico para su uso proporcionado en el presente documento puede usarse para tratar enfermedades infecciosas. La expresión "enfermedad infecciosa" incluye cualquier enfermedad causada por un agente 35 infeccioso. Un "agente infeccioso" incluye cualquier patógeno exógeno incluyendo, sin limitación, bacterias, hongos, virus, micoplasmas y parásitos. Los agentes infecciosos que pueden tratarse con las composiciones proporcionadas en esta divulgación incluyen cualquier organismo infeccioso reconocido en la técnica que cause patogénesis en un animal, incluyendo organismos tales como bacterias que son cocos o bacilos gramnegativos o grampositivos, virus de ADN y ARN, incluyendo, pero sin limitación, virus de ADN tales como virus del papiloma, parvovirus, adenovirus, virus 40 del herpes y virus vaccinia, y virus de ARN, tales como arenavirus, coronavírus, rinovirus, virus sincitiales respiratorios, virus de la gripe, picomavirus, paramixovirus, reovirus, retrovirus y rabdovirus. Los ejemplos de hongos que pueden tratarse con las composiciones y métodos de la divulgación incluyen hongos que crecen como mohos o son similares a levaduras, incluyendo, por ejemplo, hongos que causan enfermedades tales como tiña, histoplasmosis, blastomicosis, aspergilosis, criptococosis, esporotricosis, coccidioidomicosis, paracoccidioidomicosis y candidiasis. 45 Las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento pueden usarse para tratar infecciones parasitarias incluyendo, pero sin limitación, infecciones causadas por tenias somáticas, esquistosomas, nematodos tisulares, amebas y especies de *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Toxoplasma*.

### **Métodos de activación de linfocitos T GD**

Se proporciona un vector vírico que comprende al menos un elemento genético codificado, para su uso en el 50 tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa, en donde el al menos un elemento genético codificado comprende un ARN pequeño que, cuando se expresa, se dirige y reduce los niveles de expresión de farnesil difosfato sintasa (FDPS), en donde el ARN pequeño tiene una longitud de 200 nucleótidos o menos y posee una función silenciadora o de interferencia. El vector vírico para su uso sirve para su uso en la activación de linfocitos T GD en un individuo, así como métodos para tratar tumores y enfermedades infecciosas. Por ejemplo, en las realizaciones, el vector vírico para su uso proporcionado en el presente documento se puede usar en métodos para tratar todos los cánceres conocidos porque los linfocitos T GD activados comprenden un mecanismo natural para la vigilancia inmunitaria de los tumores (véase, por ejemplo: Pauza *et al.* 2014 *Frontiers in Immunol.* 5:687). De forma análoga, en las 55 realizaciones, el vector vírico para su uso proporcionado en el presente documento puede usarse para tratar enfermedades infecciosas, incluyendo, pero sin limitación, flavivirus, virus de la gripe, retrovirus humano, micobacterias, plasmódios y una diversidad de otras infecciones víricas, fúngicas y bacterianas. (Véase, por ejemplo: Pauza y Cairo, 2015 *Cell Immunol.* 296(1)).

60 En general, se administra un sistema vectorial a un individuo para transfectar o transducir una población de células diana con las construcciones divulgadas para disminuir la expresión de FDPS y, en otras realizaciones, aumentar la

65

expresión de quimiocinas o citocinas. La administración y la transfección/transducción pueden tener lugar *in vivo* o *ex vivo*, administrándose posteriormente las células transfectadas de nuevo al sujeto en el último escenario.

5 La administración de los vectores divulgados y la transfección o transducción de las construcciones divulgadas en las células de un sujeto dan como resultado una expresión disminuida de FDPS, una expresión aumentada de citocinas o quimiocinas, acumulación de IPP y, en muchos casos, tasas de crecimiento reducidas para células tumorales genéticamente modificadas. Todas estas características trabajan juntas para activar y colocalizar los linfocitos T GD en el lugar de un tumor o infección.

10 El vector vírico para su uso proporcionado en el presente documento también puede aumentar la capacidad de los linfocitos NK para reconocer y destruir células tumorales y/o células infectadas. La interferencia entre los linfocitos T GD y los linfocitos NK es un aspecto importante de la regulación de las respuestas inmunitarias e inflamatorias. Además, se sabe que los linfocitos T GD desencadenan la maduración de las células dendríticas, reclutan linfocitos B y macrófagos y participan en una diversidad de actividades citolíticas, tales como la secreción de interferón-γ y TNF-α.

15 En las realizaciones, el método para el cual se usa el vector vírico proporcionado en el presente documento comprende una forma de terapia génica para activar linfocitos T GD en el sitio de patología tumoral o de enfermedad infecciosa. En las realizaciones, el método para el cual se usa el vector vírico proporcionado en el presente documento activa los linfocitos T GD y apoya su proliferación, diferenciación y capacidades funcionales al promover la producción de citocinas específicas necesarias para la actividad citolítica capaz de matar células cancerosas o tratar enfermedades infecciosas.

20 En las realizaciones, las secuencias de terapia génica (por ejemplo, ARNh de FDPS) se transportan mediante vectores terapéuticos, incluyendo, pero sin limitación, vectores víricos tales como lentivirus o virus adenoasociados, aunque también pueden ser adecuados otros vectores víricos. Las construcciones de terapia génica también pueden administrarse en forma de ADN o ARN, incluyendo, pero sin limitación, formas plasmídicas. En las realizaciones, las construcciones de terapia génica divulgadas también pueden administrarse en forma de complejos de proteína-ácido nucleico o complejos de ácido nucleico de lípido y mezclas de estas formulaciones. Por ejemplo, un complejo de 25 proteína-ácido nucleico puede comprender ácidos nucleicos de interés en un complejo con péptidos catiónicos tales como lisina y arginina. Los complejos de lípidos y ácidos nucleicos pueden comprender emulsiones lipídicas, micelas, liposomas y/o mezclas de lípidos neutros y catiónicos tales como DOTMA, DOSPA, DOTAP y DMRIE.

30 En las realizaciones, los vectores terapéuticos pueden comprender una única construcción o al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco construcciones diferentes. Cuando más de una construcción está presente en un vector, las construcciones pueden ser idénticas o pueden ser diferentes. Por ejemplo, las construcciones pueden variar en términos de sus promotores, la presencia o ausencia de elementos integrantes y/o sus secuencias. En algunas realizaciones, un vector terapéutico comprenderá al menos una construcción que codifica un ARN pequeño capaz de atenuar la expresión de FDPS. En las realizaciones, el vector terapéutico también codificará una o más 35 citocinas y/o quimiocinas específicas, incluyendo, pero sin limitación, TNF-α, interferón-γ, IL-1, IL-2, IL-15, IL-17, IL-18 o IL-12. En algunas realizaciones, una única construcción puede codificar tanto ARN pequeños capaces de atenuar la expresión de FDPS como citocinas o quimiocinas específicas, incluyendo, pero sin limitación, TNF-α, interferón-γ, IL-1, IL-2, IL-15, IL-17, IL-18 o IL-12.

40 En las realizaciones, los vectores víricos pueden introducir construcciones de ácido nucleico que se integran en el cromosoma del hospedador. Como alternativa, pueden usarse vectores de suministro transitorio para prevenir la integración cromosómica y limitar la vida útil de las construcciones de terapia génica.

45 En las realizaciones, las construcciones y vectores divulgados comprenden ARN de región de homología corta ("ARNhc"), microARN ("miARN") o ARNip capaz de reducir o atenuar la expresión de genes de FDPS y/o geranil pirofosfato sintasa ("GPPS") y/o farnesil transferasa ("FT"). Al reprimir estos genes, que controlan la síntesis de esteroides e isoprenoides, se elevan los niveles de pirofosfato de isopentenilo ("IPP"). La elevación y acumulación de IPP es un mecanismo conocido para aumentar la activación de los linfocitos T GD. Además, la represión de estos genes de pirofosfato sintasa elimina un importante regulador negativo de la función del inflamasoma que, a su vez, da como resultado una mayor expresión de citocinas que son importantes para la activación de los linfocitos T GD y la función de las células efectoras.

50 En las realizaciones, las construcciones divulgadas están reguladas por promotores específicos que son capaces de producir interleucina-2 y/o interleucina-15 para mantener la proliferación de linfocitos T GD. Además, las construcciones divulgadas pueden estar reguladas por promotores específicos que son capaces de producir interleucina-1 beta y/o interleucina-18 y/o interferón-gamma necesarios para la diferenciación de linfocitos T GD y la adquisición de todas las funciones de las células efectoras. Las funciones de las células efectoras deseables incluyen la capacidad de destruir células citotóxicas directas de tumores y/o células infectadas, la secreción de citocinas y/o quimiocinas beneficiosas, una mayor expresión de los receptores NK necesarios para reconocer células cancerosas o infectadas y una mayor expresión de los receptores Fc necesarios para unirse a anticuerpos dirigidos para colocalizar linfocitos T GD con dianas celulares cancerosas o infectadas.

- En las realizaciones, el método para el cual se usa el vector vírico activa los linfocitos T GD, dando como resultado el efecto indirecto de aumentar la capacidad de los linfocitos NK para atacar y destruir células cancerosas, tumores o células infectadas. La activación de los linfocitos NK requiere linfocitos T GD que sean estimulados para proliferar y diferenciarse, y para expresar el ligando coestimulador 4-1BBL necesario para activar el receptor coestimulador 4-1BB en los linfocitos NK. Esta forma de interferencia se conoce como un mecanismo importante para activar los linfocitos NK y se logra aquí mediante la acción de los métodos y composiciones divulgados.
- 5 En otro aspecto, la interacción cruzada entre los linfocitos T GD y los linfocitos NK es un mecanismo importante para eliminar las células dendríticas inflamatorias que se acumulan en los tejidos enfermos. Por sí solos, ni los linfocitos T GD ni los linfocitos NK son capaces de destruir las células dendríticas, pero una vez que se han producido las interacciones cruzadas mencionadas anteriormente, los linfocitos NK se alteran para volverse citotóxicas contra las células dendríticas inflamatorias. Este mecanismo inmunorregulador depende de una fuerte activación y proliferación de linfocitos T GD.
- 10 15 En las realizaciones, el método para el cual se usa el vector vírico puede comprender además una etapa de supresión de respuestas inflamatorias patológicas que pueden incluir proliferación celular que conduce a aterosclerosis, activación inmunitaria crónica que estimula el crecimiento tumoral, enfermedades autoinmunitarias que incluyen psoriasis y otras presentaciones en la epidermis, enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central y artritis y 20 otras enfermedades de respuestas inmunitarias no reguladas.
- 20 25 En las realizaciones, los vectores terapéuticos se administran simultáneamente con fármacos de aminobisfosfonato (ABP) para lograr la activación sinérgica de los linfocitos T gamma delta. La sinergia puede permitir dosis alternativas, modificadas o reducidas de ABP y puede disminuir las reacciones adversas al ABP, incluidas respuestas inflamatorias agudas y enfermedades crónicas.
- Construcciones para la activación de linfocitos T GD**
- 30 35 La inhibición de FDPS da como resultado la acumulación de IPP, lo que da como resultado la activación de linfocitos T V $\delta$ 2+ GD y la expresión de IL-18, que también es importante en la activación de linfocitos T GD. La inhibición de la farnesil transferasa da como resultado una disminución de la prenilación de proteínas. Las construcciones divulgadas se pueden transfectar o transducir en células diana específicas, como células tumorales o células infectadas, donde pueden expresar secuencias de ARN (es decir, ARNip, ARNhC o microARN) que inhibirán la traducción de FDPS, así como codificarán y expresarán citocinas citotóxicas o quimiocinas.
- 40 45 En el presente documento se divultan construcciones para disminuir la expresión de FDPS y/o FT, aumentar la expresión de citocinas y aumentar la expresión de quimiocinas, incluyendo RANTES. Por ejemplo, en algunos aspectos como se describe en el presente documento, las construcciones pueden codificar interferón-gamma, IL-1, IL-2, IL-15, IL-17, IL-18 o IL-12.
- 45 50 La expresión de citocinas y quimiocinas, como las enumeradas anteriormente, dará como resultado una destrucción citotóxica localizada de células tumorales o células infectadas con organismos patógenos. Por consiguiente, la expresión de tales construcciones por una célula tumoral o una célula infectada dará como resultado que las células no deseadas contribuyan a su propia destrucción.
- 55 De forma análoga, si las construcciones divulgadas se expresan en una célula tumoral o en una célula infectada, la disminución de la expresión de FDPS y FT dará como resultado la activación y el reclutamiento de linfocitos T GD en el lugar de tumor o en el sitio de la infección celular. El aumento de la expresión de RANTES atraerá aún más a los linfocitos T GD a la ubicación del tejido deseada. Debido a que los linfocitos T GD pueden destruir una amplia gama de tumores de origen epitelial, así como muchas leucemias y linfomas, y además son capaces de producir altos niveles de la citocina antitumoral, IFNy, el reclutamiento de linfocitos T GD en el lugar de un tumor puede ser un medio particularmente eficaz para inducir la inmunidad antitumoral.
- 55 60 La disminución de la expresión de FDPS se puede lograr mediante ARNhC, microARN, ARNip u otros medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar ARNhC de acuerdo con las SEQ ID NOs:1, 2, 3 o 4, o variantes de las mismas, en las construcciones y métodos divulgados, aunque este ejemplo no es limitante. Las regiones codificantes de ARN para disminuir la expresión de FDPS y FT y las regiones codificantes de citocinas y quimiocinas pueden estar en la misma construcción o en construcciones diferentes.
- 60 65 El enfoque clásico para la producción de polipéptidos recombinantes o moléculas reguladoras de genes que incluyen ARN pequeño es el uso de construcciones de expresión estables. Estas construcciones se basan en la integración cromosómica de un plásmido de expresión transducido (o al menos una porción del mismo) en el genoma de la célula hospedadora, la transfección de plásmido de corta duración o vectores víricos no integrantes también con semivida limitada. Los sitios de integración genética son generalmente aleatorios y el número y la relación de genes que se integran en cualquier sitio particular son a menudo impredecibles; asimismo, los plásmidos no integrantes o los vectores víricos también generan ADN nuclear, pero estas especies suelen carecer de las secuencias necesarias para

la replicación y el mantenimiento continuo del ADN. Por lo tanto, las construcciones que dependen de la integración cromosómica dan como resultado un mantenimiento permanente del gen recombinante que puede exceder el intervalo terapéutico.

- 5 Una alternativa a las construcciones de expresión estables para la expresión génica son las construcciones de expresión transitoria. La expresión de esta última construcción de expresión génica se basa en plásmidos no integrados y, por lo tanto, la expresión típicamente se pierde a medida que la célula se divide o los vectores plasmídicos son destruidos por nucleasas endógenas.
- 10 Las construcciones divulgadas son preferentemente construcciones episómicas que se expresan de manera transitoria. Las construcciones episómicas se degradan o se diluyen con el tiempo de manera que no realizan cambios permanentes en el genoma de un sujeto ni se incorporan al cromosoma de una célula diana. El proceso de replicación episómico típicamente incorpora tanto maquinaria de replicación de la célula hospedadora como factores víricos de acción trans.
- 15 Evitar la integración cromosómica reduce ciertas barreras para el suministro de genes *in vivo*. Sin embargo, incluso las construcciones con integración defectuosa pueden tener una frecuencia de integración de fondo, y cualquier molécula de ADN puede encontrar homologías raras para recombinarse con secuencias del hospedador; pero estas tasas de integración son excepcionalmente raras y generalmente no son clínicamente significativas.
- 20 Por lo tanto, en algunos aspectos como se divulga en el presente documento, los vectores divulgados soportan el suministro de genes activos y/o ARN pequeño durante un período de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11 o aproximadamente 12 semanas. En algunos aspectos como se divulga en el presente documento, los vectores divulgados soportan el suministro de genes activos y/o ARN pequeño durante un período de aproximadamente 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses o más. También se puede usar cualquier combinación de estos períodos de tiempo en los métodos como se divulga en el presente documento, por ejemplo, 1 mes y 1 semana, o 3 meses y 2 semanas.
- 25
- 30 Sin embargo, en algunos aspectos como se divulga en el presente documento, las construcciones comprenden elementos integrantes que dependen de un gen de integrasa retrovírica, de manera que la construcción se integra en el cromosoma del sujeto. La retrotransposición y la transposición son ejemplos adicionales de mecanismos mediante los cuales los elementos genéticos móviles se integran o se insertan en el cromosoma. Los plásmidos pueden integrarse en el cromosoma mediante recombinación, y las tecnologías de edición génica, incluyendo CRISPR y TALEN, utilizan secuencias de ARN guía y alteran los locus cromosómicos mediante mecanismos de conversión génica.
- 35
- 40 Las construcciones pueden comprender promotores específicos para expresar citocinas implicadas en el mantenimiento de linfocitos T GD (es decir, IL-2, IL-7, IL-17 e IL-15). Por ejemplo, los promotores que pueden incorporarse en las construcciones divulgadas incluyen, pero sin limitación, promotores de caja TATA, promotores de caja CpG, promotores de caja CCAAT, promotores de caja TTGACA, promotores de caja BRE, promotores de caja INR, promotores basados en AT, promotores basados en CG, promotores compactos ATCG, promotores equilibrados con ATCG, promotores intermedios ATCG, promotores sin ATCG, promotores sin AT, promotores sin CG, promotores con picos AT y promotores con picos CG. Véase Gagniuc y Ionescu-Tirgoviste, Eukaryotic genomes may exhibit up to 10 generic classes of gene promoters, BMC GENOMICS 13:512 (2012).
- 45

### **Vectores terapéuticos**

- 50 Las construcciones se pueden suministrar a través de vectores de transfección y/o transducción conocidos, incluyendo, pero sin limitación, vectores lentivíricos, virus adenoasociados, poxvirus, vectores de herpesvirus, complejos proteicos y/o lípidicos, liposomas, micelas y similares.
- 55 Los vectores víricos pueden dirigirse preferentemente a tipos de células que son útiles para los métodos divulgados (es decir, células tumorales o células mieloídes). Los vectores víricos pueden usarse para transducir genes en células diana debido a interacciones específicas entre la envoltura del virus y receptores de la célula hospedadora y a mecanismos víricos para la expresión génica. Como resultado, los vectores víricos se han usado como vehículos para la transferencia de genes a muchos tipos de células diferentes, incluidos embriones completos, huevos fertilizados, muestras de tejido aisladas, dianas tisulares *in situ*, y líneas celulares cultivadas. La capacidad de introducir y expresar genes extraños en una célula es útil para el estudio de la expresión génica y para esclarecer linajes celulares, además de proporcionar la posibilidad de realizar intervenciones terapéuticas tales como terapia génica, reprogramación de células somáticas de células madre pluripotentes inducidas y varios tipos de inmunoterapia. En los vectores divulgados pueden usarse componentes víricos de virus como *Papovaviridae* (por ejemplo, virus del papiloma bovino o BPV) o *Herpesviridae* (por ejemplo, virus de Epstein Barr o EBV) o *Hepadnaviridae* (por ejemplo, virus de la hepatitis B o HBV) o vectores de la viruela, incluyendo la variolovacuna.
- 60
- 65

- Los vectores lentivíricos son un tipo de vector preferido para las composiciones y los métodos divulgados, aunque la divulgación no se limita específicamente a los vectores lentivíricos. *Lentivirus* es un género de virus que puede suministrar una cantidad significativa de ácido nucleico vírico en una célula hospedadora. Los lentivirus se caracterizan por tener una capacidad única para infectar/transducir células que no se dividen y, después de la transducción, los lentivirus integran su ácido nucleico en los cromosomas de la célula hospedadora.
- 5 Los lentivirus infecciosos tienen tres genes principales que codifican las proteínas de virulencia *gag*, *pol* y *env*, y dos genes reguladores incluyendo *tat* y *rev*. Dependiendo del serotipo y virus específicos, puede haber genes accesorios adicionales que codifiquen proteínas implicadas en la regulación, síntesis y/o procesamiento de ácidos nucleicos víricos y otras funciones replicativas.
- 10 Además, los lentivirus contienen regiones de repetición terminal larga (LTR), que pueden tener aproximadamente 600 nt de longitud. Las LTR se pueden segmentar en regiones U3, R y U5. Las LTR pueden mediar en la integración del ADN retrovírico en el cromosoma hospedador a través de la acción de la integrasa. Como alternativa, sin integrasa funcional, las LTR pueden usarse para circularizar el ácido nucleico vírico.
- 15 Las proteínas víricas implicadas en las primeras fases de la replicación de lentivirus incluyen la transcriptasa inversa y la integrasa. La transcriptasa inversa es la ADN polimerasa dependiente de ARN codificada víricamente. La enzima usa como molde el genoma de ARN vírico para la síntesis de una copia de ADN complementario. La transcriptasa inversa también tiene actividad RNaseH (ribonucleasa H) para la destrucción del molde de ARN. La integrasa se une tanto al ADN vírico generado por la transcriptasa inversa como al ADN del hospedador. La integrasa procesa la LTR antes de insertar el genoma vírico en el ADN del hospedador. *Tat* actúa como un transactivador durante la transcripción para potenciar la iniciación y elongación. El elemento de respuesta *rev* actúa postranscripcionalmente, regulando el corte y empalme del ARNm y el transporte al citoplasma.
- 20 25 Los vectores víricos, en general, comprenden glucoproteínas y las diversas glucoproteínas pueden proporcionar afinidades específicas. Por ejemplo, los péptidos VSVG pueden aumentar la transfección en células mieloides. Como alternativa, los vectores víricos también pueden tener fracciones de direccionamiento, tales como anticuerpos, unidos a sus péptidos armazón. Los anticuerpos dirigidos pueden ser específicos de抗原 que se sobreexpresan en un tumor, por ejemplo, como HER-2, PSA, CEA, M2-PK y CA19-9.
- 30 35 En la técnica también se conocen otras especificidades de vectores víricos y pueden usarse para dirigirse a poblaciones particulares de células. Por ejemplo, los vectores de poxvirus se dirigen a macrófagos y células dendríticas.
- ### Sistema de vector lentivírico
- Un virión (partícula) lentivírico se expresa mediante un sistema vectorial que codifica las proteínas víricas necesarias para producir un virión (partícula vírica). Existe al menos un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas pol lentivíricas necesarias para la transcripción inversa y la integración, unido operativamente a un promotor. En otro aspecto, las proteínas pol se expresan mediante múltiples vectores. También existe un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas gag lentivíricas necesarias para formar una cápside vírica unida operativamente a un promotor. En un aspecto, esta secuencia de ácido nucleico de gag está en un vector distinto al de al menos parte de la secuencia de ácido nucleico de pol. En otro aspecto, el ácido nucleico de gag está en un vector distinto de todas las secuencias de ácido nucleico de pol que codifican proteínas pol.
- 40 45 Se pueden realizar numerosas modificaciones en los vectores, que se usan para crear las partículas para minimizar además la posibilidad de obtener retromutantes de tipo natural. Estas incluyen, pero sin limitación, delecciones de la región U3 de la LTR, delecciones tat y delecciones de matriz (MA).
- 50 55 El vector o los vectores gag, pol y env, no contienen nucleótidos del genoma lentivírico que empaqueten el ARN lentivírico, lo que se denomina secuencia de empaquetamiento lentivírico.
- Preferentemente, el vector o los vectores que forman la partícula no contienen una secuencia de ácido nucleico del genoma lentivírico que exprese una proteína de envoltura. Preferentemente, se usa un vector distinto que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de envoltura unida operativamente a un promotor. Este vector env tampoco contiene una secuencia de empaquetamiento lentivírico. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico de env codifica una proteína de envoltura lentivírica.
- 60 65 En otro aspecto, la proteína de envoltura no es del lentivirus, si no de un virus diferente. La partícula resultante se denomina partícula seudotipificada. A través de una selección adecuada de envolturas, se puede "infectar" prácticamente cualquier célula. Por ejemplo, se puede usar un gen env que codifique una proteína de envoltura que se dirija a un compartimento endocítico tal como el del virus de la gripe, VSV-G, alfavirus (virus del bosque Semliki, virus Sindbis), arenavirus (virus de la coriomeningitis linfocítica), flavivirus (virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus del dengue, virus de la hepatitis C, virus GB), rabdovirus (virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia), paramixovirus (parotiditis o sarampión) o ortomixovirus (virus de la gripe). Otras envolturas que se pueden usar,

- incluyen preferentemente las del virus de la leucemia de Moloney tales como MLV-E, MLV-A y GALV. Estas últimas envolturas son particularmente preferidas cuando la célula hospedadora es una célula primaria. Dependiendo de la célula hospedadora deseada, pueden seleccionarse otras proteínas de envoltura. Por ejemplo, para el suministro al cerebro se puede utilizar el direccionamiento de receptores específicos, tal como un receptor de dopamina. Otra diana 5 puede ser el endotelio vascular. Estas células pueden dirigirse usando una envoltura de filovirus. Por ejemplo, la GP del Ébola, que por modificación postranscripcional se convierte en las glucoproteínas GP y GP<sub>2</sub>. En otro aspecto, se pueden usar diferentes cápsides lentivíricas con una envoltura seudotipificada (por ejemplo, FIV o SHIV [patente de EE.UU. n.º 5.654.195]). Un vector seudotipificado del SHIV (virus de la inmunodeficiencia en simios) puede usarse fácilmente en modelos animales tales como monos.
- 10 Como se detalla en el presente documento, un sistema de vector lentivírico típicamente incluye al menos un plásmido auxiliar que comprende al menos uno de un gen gag, pol o rev. Cada uno de los genes gag, pol y rev pueden proporcionarse en plásmidos individuales, o pueden proporcionarse uno o más genes juntos en el mismo plásmido. En un aspecto, los genes gag, pol y rev se proporcionan en el mismo plásmido (por ejemplo, figura 2). En otro aspecto, 15 los genes gag y pol se proporcionan en un primer plásmido y el gen rev se proporciona en un segundo plásmido (por ejemplo, figura 3). Por consiguiente, para producir un lentivirus como se describe en el apartado de Ejemplos y en otras partes del presente documento, se pueden usar sistemas de 3 y 4 vectores. El vector terapéutico, el plásmido de envoltura y al menos un plásmido auxiliar, se transfecan en una línea celular de empaquetamiento. Un ejemplo no limitante de una línea celular de empaquetamiento es la línea celular HEK 293T/17. Cuando el vector terapéutico, el 20 plásmido de envoltura y al menos un plásmido auxiliar, se transfecan en la línea celular de empaquetamiento, finalmente se produce una partícula lentivírica.
- En otro aspecto, se divulga un sistema de vector lentivírico para expresar una partícula lentivírica. El sistema incluye 25 un vector lentivírico como se describe en el presente documento; un plásmido de envoltura para expresar una proteína de envoltura optimizada para infectar una célula; y al menos un plásmido auxiliar para expresar genes gag, pol y rev, en donde, cuando el vector lentivírico, el plásmido de envoltura y el al menos un plásmido auxiliar se transfecan en una línea celular de empaquetamiento, la línea celular de empaquetamiento produce una partícula lentivírica, en donde 30 la partícula lentivírica es capaz de inhibir la producción del receptor de quimiocina CCR5 o dirigirse a una secuencia de ARN del HIV.
- 35 En otro aspecto, y como se detalla en la figura 2, el vector lentivírico, al que también se hace referencia en el presente documento como vector terapéutico, puede incluir los siguientes elementos: repetición terminal larga híbrida en el extremo 5' (RSV/5'LTR) (las SEQ ID NO: 11-12), secuencia psi (lugar de empaquetamiento de ARN) (SEQ ID NO: 13), RRE (elemento de respuesta a Rev) (SEQ ID NO: 14), cPPT (tramo de polipurina) (SEQ ID NO: 15), promotor H1 (SEQ ID NO: 16), ARNh de FDPS (SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4), elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE, por sus siglas al inglés) (SEQ ID NO: 17) y 3' Delta LTR (SEQ ID NO: 18). En otro aspecto, se puede usar variación de secuencias, a modo de sustitución, delección, adición o mutación, para modificar las secuencias a las que 40 se hace referencia en el presente documento.
- 45 En otro aspecto, y como se detalla en el presente documento, se ha diseñado un plásmido auxiliar que incluye los siguientes elementos: promotor CAG (SEQ ID NO: 19); componente gag del HIV (SEQ ID NO: 20); componente pol del HIV (SEQ ID NO: 21); Int del HIV (SEQ ID NO: 22); RRE del HIV (SEQ ID NO: 23); y Rev del HIV (SEQ ID NO: 24). En otro aspecto, el plásmido auxiliar puede modificarse para que incluya un primer plásmido auxiliar para que exprese los genes gag y pol, y un segundo plásmido distinto para que exprese el gen rev. En otro aspecto, se puede usar variación de secuencias, a modo de sustitución, delección, adición o mutación, para modificar las secuencias a las que 50 se hace referencia en el presente documento.
- 55 En otro aspecto, y como se detalla en el presente documento, se ha diseñado un plásmido de envoltura para que incluya los siguientes elementos de izquierda a derecha: promotor de ARN polimerasa II (CMV) (SEQ ID NO: 25) y glucoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) (SEQ ID NO: 26). En otro aspecto, se puede usar variación de secuencias, a modo de sustitución, delección, adición o mutación, para modificar las secuencias a las que 60 se hace referencia en el presente documento.
- 65 En otro aspecto, los plásmidos usados para el empaquetamiento lentivírico pueden modificarse con elementos similares y las secuencias intrónicas podrían eliminarse posiblemente sin pérdida de la función del vector. Por ejemplo, los siguientes elementos pueden reemplazar elementos similares en los plásmidos que comprenden el sistema de empaquetamiento: los promotores del factor de elongación 1 (EF-1), de la fosfoglicerato cinasa (PGK) y de la ubiquitina C (UbC), pueden reemplazarse por el promotor del CMV o de CAG. La poli A del SV40 A y la poli A de la bGH pueden reemplazar a la poli A de la beta globina de conejo. Las secuencias del HIV (virus de la inmunodeficiencia humana) en el plásmido auxiliar, pueden construirse a partir de diferentes cepas o clados del HIV. La glucoproteína de VSV-G se puede sustituir con glucoproteínas de membrana del virus endógeno felino (RD114), virus de la leucemia del simio gibón (GALV), la rabia (FUG), virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), el virus de la peste aviar de la gripe A (FPV), alfavirus del río Ross (RRV), virus de la leucemia murina 10A1 (MLV) o virus del Ébola (EboV).
- Cabe destacar que los sistemas de empaquetamiento lentivírico se pueden adquirir en el comercio (por ejemplo, el kit de empaquetamiento Lenti-vpak de OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD), y también pueden diseñarse como se

describe en el presente documento. Además, está dentro de la habilidad de un experto en la técnica sustituir o modificar aspectos de un sistema de empaquetamiento lentiívrico para mejorar cualquier número de factores relevantes, incluyendo la eficacia de producción de una partícula lentiívrica.

## 5 Dosis y formas farmacéuticas

Los vectores divulgados permiten la expresión a corto, medio o largo plazo de genes o secuencias de interés y el mantenimiento episómico de los vectores divulgados. Por consiguiente, las pautas posológicas pueden variar según la afección que se esté tratando y el método de administración.

10 En una realización, el vector de la invención puede administrarse a un sujeto que lo necesite en dosis variables. Específicamente, a un sujeto se le pueden administrar aproximadamente  $\geq 10^6$  dosis infecciosas (donde como promedio se necesita 1 dosis para transducir 1 célula diana). Más específicamente, a un sujeto se le pueden administrar aproximadamente  $\geq 10^7$ , aproximadamente  $\geq 10^8$ , aproximadamente  $\geq 10^9$  o aproximadamente  $\geq 10^{10}$  dosis infecciosas, o cualquier cantidad de dosis entre estos valores. Los límites superiores de la dosificación del vector de transducción se determinarán para cada indicación de enfermedad y dependerán de los perfiles de toxicidad/seguridad de cada producto individual o lote de producto.

15 Adicionalmente, el vector de la invención puede administrarse periódicamente, tal como una o dos veces al día, o cualquier otro período de tiempo adecuado. Por ejemplo, los vectores pueden administrarse a un sujeto que lo necesite una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez al mes, cada dos meses, cada tres meses, cada seis meses, cada nueve meses, una vez al año, cada dieciocho meses, cada dos años, cada treinta meses o cada tres años.

20 En una realización, el vector de la invención puede administrarse como una composición farmacéutica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica que comprende los vectores divulgados se puede formular en una amplia diversidad de formas farmacéuticas, incluyendo, pero sin limitación, formas farmacéuticas nasales, pulmonares, orales, tópicas o parenterales para aplicación clínica. Cada una de las formas farmacéuticas puede comprender diversos agentes solubilizantes, agentes disagregantes, tensioactivos, cargas, espesantes, aglutinantes, diluyentes, tales como agentes humectantes u otros excipientes farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica que comprende un vector también puede formularse para inyección, insuflación, infusión o exposición intradérmica. Por ejemplo, una formulación inyectable puede comprender los vectores divulgados en una solución acuosa o no acuosa a un pH y una tonicidad adecuados.

25 El vector de la invención puede administrarse a un sujeto mediante inyección directa en un sitio de tumor o en un sitio de infección. En algunas realizaciones, el vector de la invención se puede administrar sistémicamente. En algunas realizaciones, el vector de la invención se puede administrar canulación guiada a tejidos que rodean inmediatamente los lugares donde está el tumor o la infección.

30 El vector de la invención se puede administrar usando cualquier método farmacéuticamente aceptable, tal como intranasal, bucal, sublingual, oral, rectal, ocular, parenteral (por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía intramuscular, por vía subcutánea o por vía intraperitoneal), pulmonar, intravaginal, administrado localmente, administrado tópicamente, administrado tópicamente después de la escarificación, administrado por vía mucosa, a través de un aerosol, en medios semisólidos tales como agarosa o gelatina, o mediante una formulación de aerosol bucal o nasal.

35 Además, el vector de la invención se puede formular en cualquier forma farmacéutica farmacéuticamente aceptable, tal como una forma farmacéutica sólida, comprimido, píldora, pastilla para chupar, cápsula, dispersión líquida, gel, aerosol, aerosol pulmonar, aerosol nasal, ungüento, crema, forma farmacéutica semisólida, una solución, una emulsión y una suspensión. Además, la composición puede ser una formulación de liberación controlada, formulación de liberación sostenida, formulación de liberación inmediata, o cualquier combinación de las mismas. Además, la composición puede ser un sistema de suministro transdérmico.

40 En algunos aspectos, la composición farmacéutica que comprende un vector se puede formular en una forma farmacéutica sólida para administración oral, y la forma farmacéutica sólida puede ser polvos, gránulos, cápsulas, comprimidos o píldoras. En algunos aspectos, la forma farmacéutica sólida puede incluir uno o más excipientes tales como carbonato de calcio, almidón, sacarosa, lactosa, celulosa microcristalina o gelatina. Además, la forma farmacéutica sólida puede incluir, además de los excipientes, un lubricante tal como talco o estearato de magnesio. En algunos aspectos, la forma farmacéutica oral puede ser una forma de liberación inmediata o de liberación modificada. Las formas farmacéuticas de liberación modificada incluyen liberación controlada o lenta, liberación entérica, y similares. Los excipientes usados en las formas farmacéuticas de liberación modificada son habitualmente conocidos por un experto en la técnica.

45 En un aspecto adicional, la composición farmacéutica que comprende un vector se puede formular como una forma farmacéutica sublingual o bucal. Dichas formas farmacéuticas comprenden comprimidos sublinguales o composiciones en solución que se administran debajo de la lengua y comprimidos bucales que se colocan entre la

mejilla y la encía.

En algunos aspectos, la composición farmacéutica que comprende un vector se puede formular como una forma farmacéutica nasal. Dichas formas farmacéuticas de la presente invención comprenden composiciones de solución, suspensión y gel para suministro nasal.

En algunos aspectos, la composición farmacéutica que comprende un vector se puede formular en una forma farmacéutica líquida para administración oral, tal como suspensiones, emulsiones o jarabes. En algunos aspectos, la forma farmacéutica líquida puede incluir, además de los diluyentes sencillos habitualmente usados, tales como agua y parafina líquida, diversos excipientes tales como humectantes, edulcorantes, sustancias aromáticas o conservantes. En aspectos particulares, la composición que comprende vectores se puede formular para que sea adecuada para la administración a un paciente pediátrico.

En algún aspecto, la composición farmacéutica se puede formular en una forma farmacéutica para administración parenteral, tal como soluciones acuosas estériles, suspensiones, emulsiones, soluciones no acuosas o supositorios. En algunos aspectos, las soluciones o suspensiones pueden incluir propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres inyectables tales como oleato de etilo.

La dosificación de la composición farmacéutica puede variar dependiendo del peso del paciente, la edad, el género, el tiempo y modo de administración, la tasa de excreción y la gravedad de la enfermedad.

En algunos aspectos, el tratamiento del cáncer se realiza mediante inyección directa guiada en los tumores de las construcciones vectoriales divulgadas, usando una aguja o una canulación intravascular. En algunos aspectos, los vectores divulgados se administran en el líquido cefalorraquídeo, la sangre o la circulación linfática mediante canulación o inyección venosa o arterial, suministro intradérmico, suministro intramuscular o inyección en un órgano de drenaje cerca del lugar de la enfermedad.

### **Ejemplos**

#### **30 Ejemplo 1: Desarrollo de un sistema vectorial lentivírico**

Se desarrolló un sistema vectorial lentivírico como se resume en la figura 4 (forma circularizada). Se produjeron partículas lentivíricas en células HEK 293T/17 (adquiridas en la *American Type Culture Collection*, Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA) después de la transfección con el vector terapéutico, el plásmido de envoltura y el plásmido auxiliar. En la transfección de las células HEK 293T/17, a través de la cual se produjeron partículas víricas funcionales, se empleó el reactivo poli(etilenimina) (PEI) con objeto de aumentar la eficacia de la captación de ADN plasmídico. Los plásmidos y el ADN se añadieron inicialmente por separado en medio de cultivo sin suero a una relación de 3:1 (relación en masa de PEI con respecto a ADN). Después de 2-3 días, el medio celular se recogió y las partículas lentivíricas se purificaron mediante centrifugación y/o filtración a alta velocidad seguido de cromatografía de intercambio aniónico. La concentración de las partículas lentivíricas se puede expresar en términos de unidades transductoras/ml (UT/ml). La determinación de las UT se realizó midiendo los niveles de p24 del HIV en líquidos de cultivo (la proteína p24 se incorpora en las partículas lentivíricas), midiendo el número de copias de ADN vírico por célula mediante PCR cuantitativa, o infectando las células y usando luz (en el caso de que los vectores codifiquen marcadores de luciferasa o proteínas fluorescentes).

Como se ha mencionado anteriormente, para la producción de las partículas lentivíricas, se diseñó un sistema de 3 vectores (es decir, un sistema de empaquetamiento lentivírico de 2 vectores). En la figura 2 se muestra un esquema del sistema de 3 vectores. Resumiendo, y con referencia a la figura 2, el vector de la parte más superior es un plásmido auxiliar, que, en este caso, incluye Rev. El vector que aparece en la parte central de la figura 2 es el plásmido de envoltura. El vector de la parte más inferior es el vector terapéutico, como se describe en el presente documento.

Haciendo referencia más específicamente a la figura 2, el plásmido auxiliar más Rev incluye un potenciador de CAG (SEQ ID NO: 27); un promotor de CAG (SEQ ID NO: 19); un intrón de beta actina de pollo (SEQ ID NO: 28); un gag del HIV (SEQ ID NO: 20); un Pol del HIV (SEQ ID NO: 21); un Int del HIV (SEQ ID NO: 22); un RRE del HIV (SEQ ID NO: 23); un Rev del HIV (SEQ ID NO: 24); y una poli A de beta globina de conejo (SEQ ID NO: 29).

El plásmido de envoltura incluye un promotor del CMV (SEQ ID NO: 25); un intrón de beta globina (SEQ ID NO: 30); una VSV-G (SEQ ID NO: 28); y una poli A de beta globina de conejo (SEQ ID NO: 31).

60 *Síntesis de un sistema de empaquetamiento lentivírico de 2 vectores que incluye plásmidos auxiliares (más Rev) y de envoltura.*

#### *Materiales y métodos:*

65 *Construcción del plásmido auxiliar:* El plásmido auxiliar se construyó mediante amplificación por PCR inicial de un fragmento de ADN del plásmido pNL4-3 del HIV (NIH Aids Reagent Program) que contenía los genes Gag, Pol e

Integrasa. Se diseñaron cebadores para amplificar el fragmento con sitios de restricción EcoRI y NotI que pudieran usarse para insertar en los mismos sitios en el plásmido pCDNA3 (Invitrogen). El cebador directo era (5'-TAAGCAGAACATTCAAGAATTTGCCAGGAAGAT-3') (SEQ ID NO: 32) y el cebador inverso era (5'-CCATACAATGAATGGACACTAGGCAGGCCACGAAT-3') (SEQ ID NO: 33).

5

La secuencia para el fragmento Gag, Pol, Integrasa fue la siguiente:

```

GAATTCATGAATTTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGGAATTGGA
GGTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATCTCGGGACATA
AAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTCAACATAATTGGAAGAA
ATCTGTTGACTCAGATTGGCTGCACTTAAATTCCCATTAGTCCTATTGAGACT
GTACCAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGATGGCCAAAAGTAAACAATGGCCA
TTGACAGAAGAAAAAATAGCATTAGTAGAAATTGTACAGAAATGGAAAAG
GAAGGAAAAATTCAAAAATTGGGCCTGAAATCCATACAATACTCCAGTATT
GCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTCAAGAGAA
CTTAATAAGAGAACTCAAGATTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCCTG
CAGGGTTAAAACAGAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGCGATGCATATT
TTTCAGTTCCCTTAGATAAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTACCATACCTAG
TATAAACAAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGG
ATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCAGTGTAGCATGACAAAATCTTAGAGCC
TTTAGAAAACAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGATGATTGTAT
GTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACGTGAG
ACAACATCTGTTGAGGTGGGATTACACACCAGACAAAAACATCAGAAAGA
ACCTCCATTCTGGATGGTTATGAACCTCCATCCTGATAATGGACAGTACAG
CCTATAGTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAATTA
GTGGGAAAATTGAATTGGCAAGTCAGATTATGCAGGGATTAAAGTAAGGCAA
TTATGTAACCTCTAGGGGACCAAAGCACTAACAGAAGTAGTAGTACCAACTAAC
GAAGAACGAGCAGCTAGAACACTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAGAACCGGT
ACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAC
GGGGCAAGGCCAATGGACATATCAAATTATCAAGAGCCATTAAAAATCTGAA
AACAGGGAAAGTATGCAAGAATGAAGGGTCCCCACACTAATGATGTGAAACAAATT
AACAGAGGCAGTACAAAAATAGCCACAGAACGATAGTAATATGGGAAAGA
CTCCTAAATTAAATTACCCATACAAAGGAAACATGGGAAGCATGGTGGACAG
AGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGGAGTTGTCAATACCCCTCCCTT
AGTGAAGTTATGGTACCACTAGAGAAAGAACCCATAATAGGAGCAGAAACTTT
CTATGTAGATGGGCAGCCAATAGGGAAACTAAATTAGGAAAAGCAGGATATGT
AACTGACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCCCCCTAACGGACACAACAAATCAGAA
GACTGAGTTACAAGCAATTCTAGCTTGCAGGATTGGGATTAGAAGTAAAC

```

ATAGTGACAGACTCACAAATGCATTGGAATCATTCAAGCACAACCAGATAAG  
 AGTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAA  
 GTCTACCTGGCATGGTACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTA  
 GATAAATTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTATTTTAGATGGAATAGATA  
 AGGCCAAGAAGAACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTAGTG  
 ATTTAACCTACCACCTGTAGTAGCAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAATG  
 TCAGCTAAAAGGGAAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCCAGGAATATG  
 GCAGCTAGATTGTACACATTAGAAGGAAAGTTATCTGGTAGCAGTCATGTA  
 GCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCAGAGACAGGGCAAGAAC  
 AGCATACTCCTCTAAAATTAGCAGGAAGATGCCAGTAAAACAGTACATAC  
 AGACAATGGCAGCAATTCAACAGTACTACAGTTAAGGCCGCTGTTGGTGGC  
 GGGGATCAAGCAGGAATTGGCATTCCCTACAATCCCCAAAGTCAGGAGTAAT  
 AGAATCTATGAATAAAGAATTAAAGAAAATTATAGGACAGGTAAGAGATCAGGC  
 TGAACATCTAAGACACAGCACTACAAATGGCAGTATTCCATCCACAATTAAAAGA  
 AAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGC  
 AACAGACATACAAACTAAAGAATTACAAAACAAATTACAAAATTCAAAATT  
 TCGGGTTATTACAGGGACACAGCAGAGATCCAGTTGGAAAGGACCAGCAAAGCT  
 CCTCTGGAAAGGTGAAGGGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTACATAAAAGT  
 AGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTATGGAAAACAGATGGCAG  
 GTGATGATTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAA (SEQ ID NO: 34)

A continuación, un fragmento de ADN que contenía la secuencia de poli A de beta globina de conejo Rev, RRE con sitios de restricción flanqueantes XbaI y XmaI se sintetizó por MWG Operon. A continuación, el fragmento de ADN se insertó en el plásmido en los sitios de restricción XbaI y XmaI. La secuencia de ADN era la siguiente:

TCTAGAATGGCAGGAAGAAGCGGAGACACGGACGAAGAGCTCATCAGAACAGT  
 CAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCAATCCGAGGGGACC  
 CGACAGGCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGAT  
 CCATTCGATTAGTGAACGGATCCTGGCACTTATCTGGGACGATCTCGGGAGCCT  
 GTGCCTCTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATT  
 GTGGAACCTCTGGGACGCAGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAAATCTC  
 CTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGAGGAGCTTGTCTGGTTCT  
 TGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGG  
 CCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACATTGCTGAGGGCTAT  
 TGAGGCAGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGCATCAAGCAGCTCCA

GGCAAGAACCTGGCTGTGAAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCT  
 TTTCCCTCTGCCAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTGAGCATCTGACT  
 TCTGGCTAATAAAGGAAATTATTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTG  
 TCTCTCACTCGGAAGGCATATGGGAGGGCAAATCATTAAAACATCAGAATGA  
 GTATTGGTTAGAGTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAG  
 GTGGCTATAAAGAGGTACAGTATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTA  
 TTCCATAGAAAAGCCTGACTTGAGGTTAGATTTTTATATTTGTTGTGTT  
 ATTTTTCTTAAACATCCCTAAAATTTCCTACATGTTTACTAGCCAGATTTT  
 CCTCCTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGCCCTTCTTATGAAGATCCC  
 TCGACCTGCAGCCAAGCTGGCGTAATCATGGCATAGCTGTTCTGTGAA  
 ATTGTTATCCGCTCACAAATTCCACACAACATACGAGCCGAAGCATAAAGTGTAA  
 AGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTG  
 CCCGCTTCCAGTCGGAAACCTGTCGTGCCAGCGGATCCGATCTCAATTAGTC  
 AGCAACCATACTCCGCCCTAACTCCGCCATCCGCCCTAACTCCGCCAGT  
 TCCGCCATTCTCCGCCCTGGCTGACTAATTTTTATTCAGAGGCCGA  
 GGCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTGGAGGC  
 CTAGGCTTGCAAAAGCTAACTTGTATTGAGCTATAATGGTTACAAATA  
 AAGCAATAGCATCACAAATTCAAAATAAGCATTTCAGCGGCCGCCGGG (SEQ ID  
 NO: 35)

- Finalmente, el promotor del CMV de pCDNA3.1 se reemplazó por el potenciador/promotor de CAG más una secuencia intrónica de la beta actina de pollo. En MWG Operon, se sintetizó un fragmento de ADN que contenía la secuencia potenciador/promotor/intrón de CAG con sitios de restricción flanqueantes MluI y EcoRI. Después, el fragmento de ADN se insertó en el plásmido en los sitios de restricción MluI y EcoRI. La secuencia de ADN era la siguiente:
- 5

ACCGGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTCATAGCCATAT  
 ATGGAGTTCCCGCGTTACATAACTACGGTAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCA  
 ACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTCCTAGTAACGCCAAT  
 AGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCACTTG  
 GCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACG  
 GTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTCTAC  
 TTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCAGGTGAGCCC  
 CACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCCCCACCCCCAATTGTATT  
 ATTATTTTAATTATTTGTCAGCGATGGGGCGGGGGGGGGGGCGCGC

GCCAGGCAGGGCGGGCGGGCGAGGGCGGGCGGGCGAGGCGGAGAGGTG  
 CGCGGCAGCCAATCAGAGCGCGCGCTCCGAAAGTTCTTATGGCGAGGC  
 GGCAGGCAGGGCGGCCCTATAAAAGCGAAGCGCGGGCGGGAGTCGCT  
 GCGTTGCCTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCCTCGCGCCGCCGCCC  
 TCTGACTGACCGCTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTCCTCC  
 GGGCTGTAATTAGCGCTGGTTAATGACGGCTCGTTCTTCTGTGGCTGCGTG  
 AAAGCCTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGG  
 GGTGCGTGCCTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCCTCGCGCTGCCG  
 CGGGCTGTGAGCGCTGCAGGGCGCGGGCGGGCTTGTGCGCTCCGCGTGTGCG  
 CGAGGGAGCGCGGCCGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGCTGCGAGGG  
 GAACAAAGGCTGCGTGCAGGGTGTGCGTGGGGGGTGAGCAGGGGTGTGG  
 GCGCGGCAGGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGC  
 ACGGCCCCGGCTCGGGTGCAGGGCTCCGTGCAGGGCGTGGCGCGGGCTCGCCG  
 TGCCGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGTGCCGGCGGGCGGGCGCCT  
 CGGGCCGGGGAGGGCTGGGGAGGGCGCGGGCGGGCGAGCGCCGGCGC  
 TGTGAGGCGCGAGCCGAGCCATTGCTTATGTAATCGTGCAGAG  
 GCGCAGGGACTCCTTGTCCAAATCTGGCGAGCCAAATCTGGGAGGC  
 GCCGCACCCCCCTCTAGCGGGCGGGCGAAGCGGTGCAGGGCGCCGGAGGAAGG  
 AAATGGCGGGGAGGGCCTCGTGCCTGCGCCGCCGTCCCTCTCCATCT  
 CCAGCCTCGGGCTGCCGAGGGGACGGCTGCCTCGGGGGACGGGAGG  
 GCGGGGTTGGCTCTGGCGTGTGACCGCGGGAATT (SEQ ID NO: 36)

*Construcción del plásmido de envoltura de VSV-G:*

- 5 La secuencia de la glucoproteína del virus de la cepa Indiana de la estomatitis vesicular (VSV-G), se sintetizó en MWG Operon con sitios de restricción EcoRI flanqueantes. A continuación, el fragmento de ADN se insertó en el plásmido pCDNA3.1 (Invitrogen) en el sitio de restricción EcoRI y, a través de secuenciación, se determinó la orientación correcta usando un cebador específico de CMV. La secuencia de ADN era la siguiente:

GAATTCATGAAGTGCCTTGTACTTAGCCTTTATTCAATTGGGGTAATTGCAA  
 GTTCACCATAGTTTCCACACAACCAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTCTTCT  
 AATTACCAATTGCCCCGTCAAGCTCAGATTAAATTGGCATAATGACTTAATAG  
 GCACAGCCTTACAAGTCAAAATGCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACG  
 GTTGGATGTGTCATGCTTCAAATGGGTCACTACTTGTGATTCCGCTGGTATGG  
 ACCGAAGTATATAAACACATTCCATCCGATCCTCACTCCATCTGTAGAACATGC  
 AAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACCTGGCTGAATCCAGGCTCCCT

CCTCAAAGTTGTGGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCCAG  
 GTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATAACACAGGAGAATGGGTTGATTCAC  
 AGTCATCAACGGAAAATGCAGCAATTACATATGCCCACTGTCCATAACTCTAC  
 AACCTGGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTCC  
 ATGGACATCACCTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGAAAGGAG  
 GGCACAGGGTTCAGAAGTAACTACTTGCTTATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGC  
 AAAATGCAATACTGCAAGCATTGGGAGTCAGACTCCCCTCAGGTGTCGGTTCG  
 AGATGGCTGATAAGGATCTCTTGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCAGAAGG  
 GTCAAGTATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTAATTCAAGGAC  
 GTTGAGAGGATCTGGATTATTCCCTCTGCCAAGAACCTGGAGCAAAATCAGA  
 GCGGGTCTCCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATCTGCTCCTAAAAACCCAG  
 GAACCGGTCTGCTTCACCATAATCAATGGTACCCCTAAAATACTTGAGACCAG  
 ATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATGGTCGGAATGATC  
 AGTGGAACTACCACAGAAAGGGAACTGTGGGATGACTGGCACCATATGAAGAC  
 GTGGAAATTGGACCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTCAGGATATAAGTTCCCT  
 TATACATGATTGGACATGGTATGTTGGACTCCGATCTCATCTTAGCTCAAAGGC  
 TCAGGTGTTCGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCTCGCAACTCCTGATGAT  
 GAGAGTTATTTTGGTGTACTGGCTATCCAAAATCCAATCGAGCTTGTAG  
 AAGGTTGGTCAGTAGTGGAAAAGCTTATTGCCTTTTCTTATCATAGGG  
 TTAATCATTGGACTATTCTGGTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTGCATTAAATT  
 AAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTATACAGACATAGAGATGAGAATT (SEQ  
 ID NO: 37)

- usando los métodos y materiales descritos en el presente documento también se ha diseñado y producido un sistema de 4 vectores (es decir, un sistema de empaquetamiento lentivírico de 3 vectores). En la figura 3 se muestra un esquema del sistema de 4 vectores. Resumiendo, y con referencia a la figura 3, el vector de la parte más superior es un plásmido auxiliar, que, en este caso, no incluye Rev. El segundo vector de la parte superior es un plásmido Rev distinto. El segundo vector de la parte inferior el plásmido de envoltura. El vector situado más abajo es el vector terapéutico descrito previamente.
- Haciendo referencia, en parte, a la figura 2, el plásmido auxiliar incluye un potenciador de CAG (SEQ ID NO: 27); un promotor de CAG (SEQ ID NO: 19); un intrón de beta actina de pollo (SEQ ID NO: 28); un gag del HIV (SEQ ID NO: 20); un Pol del HIV (SEQ ID NO: 21); un Int del HIV (SEQ ID NO: 22); un RRE del HIV (SEQ ID NO: 23); y una poli A de beta globina de conejo (SEQ ID NO: 29).
- El plásmido Rev incluye un promotor del RSV (SEQ ID NO: 38); un Rev del HIV (SEQ ID NO: 39); y una poli A de beta globina de conejo (SEQ ID NO: 29).

El plásmido de envoltura incluye un promotor del CMV (SEQ ID NO: 25); un intrón de beta globina (SEQ ID NO: 30); una VSV-G (SEQ ID NO: 28); y una poli A de beta globina de conejo (SEQ ID NO: 29).

*Síntesis de un sistema de empaquetamiento lentivírico de 3 vectores que incluye los plásmidos auxiliar, Rev y de envoltura.*

*Materiales y métodos:*

*Construcción del plásmido auxiliar sin Rev:*

El plásmido auxiliar sin Rev se construyó insertando un fragmento de ADN que contenía la secuencia de RRE y poli A de beta globina de conejo. Esta secuencia se sintetizó en MWG Operon con sitios de restricción XbaI y XmaI

flanqueantes. A continuación, se insertó la secuencia de RRE/poli A beta globina de conejo en el plásmido auxiliar en los sitios de restricción XbaI y XmaI. La secuencia de ADN es la siguiente:

```
TCTAGAAGGAGCTTGTCCCTGGGTCTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGC
GCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGC
AGCAGCAGAACAAATTGCTGAGGGCTATTGAGGCAGAACAGCATCTGTTGCAAC
TCACAGTCTGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAACAGCATCTGTTGCAAC
ACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATCTTCTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGA
CATCATGAAGCCCCCTGAGCATTGACTCTGGCTAATAAAGGAAATTATTTCT
ATTGCAATAGTGTGGATTTCGTCTCACTCGGAAGGACATATGGGA
GGCAAATCATTAAAACATCAGAATGAGTATTGGTTAGAGTTGGCAACATA
TGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCACTAGTATAT
GAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCCATAGAAAAGCCTGACTTGAGGT
TAGATTTTTTATATTGTTGTATTCTTCTTAAACATCCCTAAATT
CCTTACATGTTTACTAGCCAGATTTCCTCCTCTGACTACTCCCAGTCATA
GCTGTCCCTCTCTTATGAAGATCCCTCGACCTGCAGCCAAGCTTGGCGTAAT
CATGGTCATAGCTGTTCTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATTCCACACAAAC
ATACGAGCCGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA
CTCACATTAATTGCGTTGCCTCACTGCCGCTTCCAGTCGGAAACCTGTCGT
GCCAGCGGATCCGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATACTCCGCCCTAACTCCG
CCCATCCGCCCTAACTCCGCCAGTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACT
AATTTTTTATTCAGAGGCCAGGCCCTGGCTCTGAGCTATTCCAG
AAGTAGTGAGGAGGCTTTGGAGGCCTAGGCTTTGCAAAAGCTAACTGTT
TATTGCAGCTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCAACAAAT
AAAGCATTTCCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAATGTATC
```

5

TTATCACCCGGG (SEQ ID NO: 35)

*Construcción del plásmido Rev:*

- 10 El promotor del RSV y la secuencia de Rev del HIV se sintetizaron como un solo fragmento de ADN en MWG Operon con sitios de restricción MfeI y XbaI flanqueantes. A continuación, el fragmento de ADN se insertó en el plásmido pCDNA3.1 (Invitrogen) en los sitios de restricción MfeI y XbaI en los que el promotor del CMV se reemplazó por el promotor del RSV. La secuencia de ADN era la siguiente:

CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATA CGGTATCTGAGGGACTAGGGTGTGTT  
 AGCGAAAAGCGGGCTCGGTTGACCGGTTAGGAGTCCCCTCAGGATATAG  
 TAGTTCGCTTGCATAGGGAGGGAAATGAGTCTATGCAATA CACTGTA  
 GTCTTGCAACATGGAACATGAGTTAGCAACATGCCTACAAGGAGAGAAAAA  
 GCACCGTGCATGCCGATTGGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCCTATTAGGA  
 AGGCAACAGACAGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCCGCATTGCA  
 GAGATAATTGTTAAGTGCCTAGCTGATACAATAACGCCATTGACCATTG  
 ACCACATTGGTGTGCACCTCCAAGCTCGAGCTCGTTAGTGAACCGTCAGATCGC  
 CTGGAGACGCCATCCACGCTGTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCC  
 AGCCTCCCTCGAAGCTAGCGATTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAACGGAG  
 ACAGCGACGAAGAACTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTCTATCAA  
 GCAACCCACCTCCAATCCCGAGGGACCCGACAGGCCGAAGGAATAGAAGA  
 AGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATCCT  
 AGCACTTATCTGGGACGATCTCGGGAGCCTGTGCCTCTCAGCTACCACCGCTT  
 AGAGACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTCTGGGACGCAGGGGGT  
 GGGAAAGCCCTCAAATATTGGTGGAACTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAA  
 AGAATAGTCTAGA (SEQ ID NO: 40)

Los plásmidos para los sistemas de empaquetamiento de 2 y 3 vectores podrían modificarse con elementos similares y las secuencias intrónicas podrían eliminarse potencialmente sin pérdida de la función del vector. Por ejemplo, los

5 siguientes elementos podrían reemplazar elementos similares en el sistema de empaquetamiento de 2 y 3 vectores: Promotores: El promotor del factor de elongación 1 (EF-1) (SEQ ID NO: 41), de la fosfoglicerato cinasa (PGK) (SEQ ID NO: 42) y de la ubiquitina C (UbC) (SEQ ID NO: 43), pueden reemplazarse por el promotor del CMV (SEQ ID NO: 25) o de CAG (SEQ ID NO: 19). Estas secuencias también pueden modificarse mediante adición, sustitución, delección o mutación.

10 Secuencias de poli A: La poli A de SV40 (SEQ ID NO: 44) y la poli A de bGH (SEQ ID NO: 45), pueden reemplazar a la poli A de beta globina de conejo (SEQ ID NO: 29). Estas secuencias también pueden modificarse mediante adición, sustitución, delección o mutación.

15 Secuencias Gag, Pol e Integrasa del HIV: Las secuencias del HIV en el plásmido auxiliar pueden construirse a partir de diferentes cepas o clados del HIV. Por ejemplo, Gag del HIV (SEQ ID NO: 20); Pol del HIV (SEQ ID NO: 21); y Int del HIV (SEQ ID NO: 22) de la cepa Bal se pueden intercambiar con las secuencias gag, pol e int contenidas en los plásmidos auxiliares/auxiliares más Rev como se describe en el presente documento. Estas secuencias también pueden modificarse mediante adición, sustitución, delección o mutación.

20 Envoltura: La glucoproteína de VSV-G se puede sustituir con glucoproteínas de membrana del virus endógeno felino (RD114) (SEQ ID NO: 46), virus de la leucemia del simio gibón (GALV) (SEQ ID NO: 47), la rabia (FUG) (SEQ ID NO: 48), virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) (SEQ ID NO: 49), virus de la peste aviar de la gripe A (FPV) (SEQ ID NO: 50), alfavírus del río Ross (RRV) (SEQ ID NO: 51), virus de la leucemia murina 10A1 (MLV) (SEQ ID NO: 52), o virus del Ébola (EboV) (SEQ ID NO: 53). Las secuencias de estas envolturas se identifican en la parte de secuencia del presente documento. Además, estas secuencias también pueden modificarse mediante adición, sustitución, delección o mutación.

30 En resumen, los sistemas de 3 vectores frente a los de 4 vectores se pueden comparar y contrastar, en parte, de la siguiente manera. El sistema vectorial lentivírico de 3 vectores contiene: 1. Plásmido auxiliar: Gag, Pol, Integrasa y Rev/Tat del HIV; 2. Plásmido de envoltura: envoltura VSV-G/FUG; y 3. Vector terapéutico: RSV 5'LTR, Señal de empaquetamiento Psi, fragmento gag, RRE, fragmento env, cPPT, WPRE y 3'delta LTR. El sistema vectorial lentivírico de 4 vectores contiene: 1. Plásmido auxiliar: Gag, Pol e Integrasa del HIV; 2. Plásmido Rev: Rev; 3. Plásmido de envoltura: envoltura VSV-G/FUG; y 4. Vector terapéutico: RSV 5'LTR, Señal de empaquetamiento Psi, fragmento gag, RRE, fragmento env, cPPT, WPRE y 3'delta LTR. Las secuencias correspondientes a los elementos anteriores se identifican en la parte de listados de secuencias del presente documento.

**Ejemplo 2: Desarrollo de un vector lentivírico que expresa FDPS**

El objetivo de este Ejemplo fue desarrollar un vector lentivírico de FDPS.

**Diseño de ARN inhibidor:** Para atenuar los niveles de FDPS en células humanas, se usó la secuencia de ARNm de farnesil difosfato sintasa (FDPS) de Homo sapiens (NM\_002004.3) para buscar posibles candidatos a ARNip o ARNhC. Las posibles secuencias de interferencia de ARN se eligieron entre las candidatas seleccionadas por los programas de diseño de ARNip o ARNhC, como los del GPP Web Portal del Broad Institute (<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/>) o BLOCK-iT RNAi Designer de Thermo Scientific (<https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/>). Se insertaron secuencias de ARNhC seleccionadas individualmente en un vector lentivírico inmediatamente 3 cebadores con respecto a un promotor de ARN polimerasa III tal como H1 (SEQ ID NO: 16), U6 (SEQ ID NO: 54) o 7SK (SEQ ID NO: 55) para regular la expresión de ARNhC. Estas construcciones de ARNhC de lentivirus se usaron para transducir células y medir el cambio de los niveles específicos de ARNm. El ARNhC más fuerte para reducir los niveles de ARNm se incorporó individualmente en una cadena principal de microARN para permitir la expresión por parte de los promotores de ARN polimerasa II del EF-1alfa o del CMV. La cadena principal de microARN se seleccionó de mirbase.org. También se sintetizaron secuencias de ARN como oligonucleótidos de ARNip sintéticos y se introdujeron directamente en las células sin usar ningún vector lentivírico.

**Construcciones vectoriales:** Para el ARNhC de la FDPS, en Eurofins MWG Operon, se sintetizaron secuencias de oligonucleótidos que contenían sitios de restricción BamHI y EcoRI. Las secuencias de oligonucleótidos codificante y no codificantes solapantes se mezclaron y se hibridaron durante enfriamiento de 70 grados centígrados a temperatura ambiente. El vector lentivírico se digirió con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI durante una hora a 37 grados centígrados. El vector lentivírico digerido se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa y se extrajo del gel usando un kit de extracción de ADN en gel de Thermo Scientific. Se determinaron las concentraciones de ADN y se mezclaron el vector y el oligo (relación 3:1), se permitió la hibridación y se ligaron. La reacción de ligadura se realizó con ADN ligasa de T4 durante 30 minutos a temperatura ambiente. A 25 microlitros de células bacterianas competentes STBL3, se añadieron 2,5 microlitros de la mezcla de ligadura. La transformación se logró después de un choque térmico a 42 grados centígrados. Las células bacterianas se diseminaron en placas de agar que contenían ampicilina y las colonias resistentes a fármaco (que indicaban la presencia de plásmidos resistentes a ampicilina) se recuperaron y se expandieron en caldo LB. Para comprobar la inserción de las oligosecuencias, el ADN plasmídico se extrae de cultivos bacterianos recogidos con el kit mini prep de ADN de Thermo Scientific. La inserción de secuencias de ARNhC en el vector lentivírico se verificó mediante secuenciación de ADN usando un cebador específico para el promotor usado para regular la expresión de ARNhC. Usando las siguientes secuencias diana, se determinaron secuencias de ARNhC ilustrativas para atenuar la FDPS:

35 GTCCTGGAGTACAATGCCATT (secuencia diana n.º 1 de FDPS; SEQ ID NO: 56);

GTCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTT

(Secuencia de ARNhC n.º 1 de FDPS; SEQ ID NO: 1);

40 GCAGGATTTCGTCAGCACTT (secuencia diana n.º 2 de FDPS; SEQ ID NO: 57);

GCAGGATTTCGTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTT

(Secuencia de ARNhC n.º 2 de FDPS; SEQ ID NO: 2);

GCCATGTACATGGCAGGAATT secuencia diana n.º 3 de FDPS; SEQ ID NO: 58);

45 GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTGCCATGTACATGGCTTTT

(Secuencia de ARNhC n.º 3 de FDPS; SEQ ID NO: 3);

50 GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGT (secuencia diana n.º 4 de FDPS; SEQ ID NO: 59); y

GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTTGCTTTT

(Secuencia de ARNhC n.º 4 de FDPS; SEQ ID NO: 4).

A continuación, las secuencias de ARNhC se ensamblaron en un microARN (miR) sintético bajo el control del promotor EF-1 alfa. En resumen, se obtuvo una secuencia en horquilla de miR, tal como miR30, miR21 o miR185 como se detalla a continuación, en mirbase.org. Para construir la secuencia de miR sintética se usó la secuencia diana de ARNhC de 19-22 unidades monoméricas (meros). La secuencia de miR se dispuso como una secuencia diana no codificante-secuencia de bucle en horquilla (específica de cada microARN)-secuencia diana codificante.

Se desarrollaron las siguientes secuencias de miR:

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAA  
 GCCACAGATGGCAGAAGGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCA  
 AGGGGCT (Secuencia n.º 1 de miR30 FDPS; SEQ ID NO: 5)

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAA  
 GCCACAGATGGCAGAAGGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAG  
 GGGCT (Secuencia n.º 2 de miR30 FDPS; SEQ ID NO: 6)

5 TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTAAGCCACAGATGG  
 CAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTACTGCCTCGGA (Secuencia n.º 3 de miR30 FDPS;  
 SEQ ID NO: 7)

CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTCAGCCTCCTCTGCTTTGG  
 CCACTGACTGAGCAGAAGGGCTGAGAAAGTCAGGACACAAGGCCTGTTACTAGC  
 ACTCA (Secuencia n.º 1 de miR155 FDPS; SEQ ID NO: 8)

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTGGACTTCAGCCTCCTCTGCTGTTG  
 AATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATTTGGTATCTTCATCTGA  
 CCA (Secuencia n.º 1 de miR21 FDPS; SEQ ID NO: 9)

10 GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTCAGCCTCCTCTGCTGGTC  
 CCCTCCCCGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTCCCTCCAATGACCGCGTCTTC  
 GTCG (Secuencia n.º 1 de miR185 FDPS; SEQ ID NO: 10)

Ejemplo 3 - Atenuación de FDPS durante 3 días en leucemia monocítica THP1 mediante ARNhc n.º 4

15 Este ejemplo ilustra que la atenuación de FDPS en células de leucemia monocítica THP1 mediante el ARNhc n.º 4 de FDPS que expresa lentivirus (LV) estimula la expresión de TNF- $\alpha$  en linfocitos T gamma delta, como se muestra en la figura 5.

20 Las células THP1 ( $1 \times 10^5$  células) se transdijeron durante 3 días con LV-control o ARNhc n.º 4 de LV-FDPS. Dos días después de la transducción, las células se trataron con o sin ácido zoledrónico 1  $\mu$ M. Después de 24 horas, las células THP-1 transducidas se cultivaron conjuntamente durante 4 horas con  $5 \times 10^5$  células PBMC e IL-2 en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Las células PBMC se estimularon previamente con ácido zoledrónico e IL-2 durante 11 días para expandir linfocitos T Vy9V $\delta$ 2. Después de la tinción de Vy9V $\delta$ 2 y TNF- $\alpha$  usando un anticuerpo anti TCR-V $\delta$ 2 y anti TNF- $\alpha$  conjugado con fluoróforo, las células se analizaron mediante citometría de flujo. Se escogieron las células vivas y las células V $\delta$ 2+ y TNF- $\alpha$ + se seleccionaron en una transferencia puntual. Los linfocitos T citotóxicos Vy9V $\delta$ 2 activados aparecieron en el cuadrante superior derecho de los citogramas de flujo. Sin ácido zoledrónico, LV-control estimuló un 3,1 % de linfocitos T Vy9V $\delta$ 2 que expresaban TNF- $\alpha$  y el ARNhc n.º 4 de LV-FDPS estimuló un 5 %. Con tratamiento de ácido zoledrónico, LV-control estimuló un 7,2 % de linfocitos T Vy9V $\delta$ 2 que expresaban TNF- $\alpha$  y el ARNhc n.º 4 de LV-FDPS estimuló un 56,2 %.

Ejemplo 4 - Atenuación de FDPS durante 14 días en células de leucemia THP1 mediante ARNhc n.º 4

35 Este Ejemplo ilustra que la atenuación de FDPS durante 14 días en células de leucemia THP1 mediante ARNhc n.º 4 de FDPS que expresa lentivirus (LV) estimula la expresión de TNF- $\alpha$  en linfocitos T GD, como se muestra en la figura 6.

40 Las células THP1 ( $1 \times 10^5$  células) se transdijeron durante 14 días con LV-control o ARNhc n.º 4 de LV-FDPS. Dos días después de la transducción, las células se trataron con o sin ácido zoledrónico 1  $\mu$ M. Después de 24 horas, las células THP-1 transducidas se cultivaron conjuntamente durante 4 horas con  $5 \times 10^5$  células PBMC e IL-2 en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Las células PBMC se estimularon previamente con ácido zoledrónico e IL-2 durante 11 días para expandir linfocitos T Vy9V $\delta$ 2. Después de la tinción de Vy9V $\delta$ 2 y TNF- $\alpha$  usando un anticuerpo anti TCR-V $\delta$ 2 y anti TNF- $\alpha$  conjugado con fluoróforo, las células se analizaron mediante citometría de flujo. Se escogieron las células vivas y las células V $\delta$ 2+ y TNF- $\alpha$ + se seleccionaron en una transferencia puntual. Los linfocitos T citotóxicos Vy9V $\delta$ 2 activados aparecieron en el cuadrante superior derecho de los citogramas de flujo. Sin ácido

zoledrónico, LV-control estimuló un 0,9 % de linfocitos T Vy9Vδ2 que expresaban TNF-α y el ARNhc n.º 4 de LV-FDPS (SEQ ID NO: 4) estimuló un 15,9 %. Con tratamiento de ácido zoledrónico, LV-control estimuló un 4,7 % de linfocitos T Vy9Vδ2 que expresaban TNF-α y el ARNhc n.º 4 de LV-FDPS (SEQ ID NO: 4) estimuló un 76,2 %.

5 **Ejemplo 5 - Atenuación de FDPS durante 3 días en células de carcinoma de próstata PC3 mediante ARNhc n.º 1**

Este Ejemplo ilustra que la atenuación de FDPS durante 3 días en células de carcinoma de próstata PC3 mediante ARNhc n.º 1 de FDPS que expresa lentivirus (LV) estimula la expresión de TNF-α en linfocitos T GD, como se muestra 10 en la figura 7.

Se transdijeron células PC3 con LV-control o ARNhc n.º 1 de LV-FDPS (SEQ ID NO: 1) durante 3 días. Dos días 15 después de la transducción, las células se trataron con o sin ácido zoledrónico 1 uM. Después de 24 horas, las células PC3 transducidas se cultivaron conjuntamente durante 4 horas con  $5 \times 10^5$  células PBMC e IL-2 en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Las células PBMC se estimularon previamente con ácido zoledrónico e IL-2 durante 11 días para expandir linfocitos T Vy9Vδ2. Después de la tinción de Vy9Vδ2 y TNF-α usando un anticuerpo anti TCR-Vδ2 y 20 anti TNF-α conjugado con fluoróforo, las células se analizaron mediante citometría de flujo. Se escogieron las células vivas y las células Vδ2+ y TNF-α+ se seleccionaron en una transferencia puntual. Los linfocitos T citotóxicos Vy9Vδ2 activados aparecieron en el cuadrante superior derecho de los citogramas de flujo. Sin ácido zoledrónico, LV-control estimuló un 0,2 % de linfocitos T Vy9Vδ2 que expresaban TNF-α y el ARNhc n.º 1 de LV-FDPS estimuló un 0,5 %. Con tratamiento de ácido zoledrónico, LV-control estimuló un 1,7 % de linfocitos T Vy9Vδ2 que expresaban TNF-α y el ARNhc n.º 1 de LV-FDPS (SEQ ID NO: 1) estimuló un 32,2 %.

25 **Ejemplo 6 - Atenuación de FDPS durante 3 días en células de carcinoma de próstata PC3 mediante ARNhc n.º 4**

Este Ejemplo ilustra que la atenuación de FDPS durante 3 días en células de carcinoma de próstata PC3 mediante ARNhc n.º 4 de FDPS que expresa lentivirus (LV) estimula la expresión de TNF-α en linfocitos T GD, como se muestra 30 en la figura 8.

Se transdijeron células PC3 con LV-control o ARNhc n.º 4 de LV-FDPS (SEQ ID NO: 4) durante 3 días. Dos días después de la transducción, las células se trataron con o sin ácido zoledrónico 1 uM. Después de 24 horas, las células PC3 transducidas se cultivaron conjuntamente durante 4 horas con  $5 \times 10^5$  células PBMC e IL-2 en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Las células PBMC se estimularon previamente con ácido zoledrónico e IL-2 durante 11 días para expandir linfocitos Vy9Vδ2. Después de la tinción de Vy9Vδ2 y TNF-α usando un anticuerpo anti TCR-Vδ2 y 35 anti TNF-α conjugado con fluoróforo, las células se analizaron mediante citometría de flujo. Se escogieron las células vivas y las células Vδ2+ y TNF-α+ se seleccionaron en una transferencia puntual. Los linfocitos T citotóxicos Vy9Vδ2 activados aparecieron en el cuadrante superior derecho de los citogramas de flujo. Sin ácido zoledrónico, LV-control estimuló un 0,5 % de linfocitos T Vy9Vδ2 que expresaban TNF-α y el ARNhc n.º 4 de LV-FDPS (SEQ ID NO: 4) estimuló un 1,9 %. Con tratamiento de ácido zoledrónico, LV-control estimuló un 2,1 % de linfocitos T Vy9Vδ2 que expresaban TNF-α y el ARNhc n.º 4 de LV-FDPS estimuló un 28,7 %.

40 **Ejemplo 7 - Atenuación de FDPS durante 3 días en células de carcinoma de hígado HepG2 mediante ARNhc n.º 1 y n.º 4**

Este Ejemplo ilustra que la atenuación de FDPS durante 3 días en células de carcinoma de hígado HepG2 mediante ARNhc n.º 1 (SEQ ID NO: 1) de FDPS que expresa lentivirus (LV) y ARNhc n.º 4 (SEQ ID NO: 4) estimula la expresión 45 de TNF-α en linfocitos T GD, como se muestra en la figura 9.

Se transdijeron células HepG2 con LV-control, ARNhc n.º 1 de LV-FDPS (SEQ ID NO: 1), o ARNhc n.º 4 de LV-FDPS (SEQ ID NO: 4) durante 3 días. Dos días después de la transducción, las células se trataron con o sin ácido zoledrónico 1 uM. Después de 24 horas, las células HepG2 transducidas se cultivaron conjuntamente durante 4 horas con  $5 \times 10^5$  células PBMC e IL-2 en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Las células PBMC se estimularon previamente con ácido zoledrónico e IL-2 durante 11 días para expandir linfocitos Vy9Vδ2. Después de la tinción de Vy9Vδ2 y TNF-α usando un anticuerpo anti TCR-Vδ2 y anti TNF-α conjugado con fluoróforo, las células se analizaron mediante 50 citometría de flujo. Se escogieron las células vivas y las células Vδ2+ y TNF-α+ se seleccionaron en una transferencia puntual. Los linfocitos T citotóxicos Vy9Vδ2 activados aparecieron en el cuadrante superior derecho de los citogramas de flujo. Sin ácido zoledrónico, LV-control estimuló un 0,4 % de linfocitos T Vy9Vδ2 que expresaban TNF-α y ARNhc n.º 1 de LV-FDPS (SEQ ID NO: 1) y n.º 4 (SEQ ID NO: 4) estimularon un 0,7 % y un 0,9 %, respectivamente. Con 55 tratamiento de ácido zoledrónico, LV-control estimuló un 6,9 % de linfocitos T Vy9Vδ2 que expresaban TNF-α y ARNhc n.º 1 y n.º 4 de LV-FDPS estimularon un 7,6 % y un 21,1 %, respectivamente.

60 **Ejemplo 8 - Atenuación de FDPS durante 3 días en leucemia THP1 por microARN-30**

Este ejemplo ilustra que la atenuación de FDPS durante 3 días en células de leucemia THP1 mediante microARN-30 sintético dirigido a FDPS que expresa lentivirus (LV) estimula la expresión de TNF-α en linfocitos T gamma delta, como 65

se muestra en la figura 10.

Se transdijeron células THP1 ( $1 \times 10^5$  células) con LV-control o LV-miR30 FDPS n.º 1 (SEQ ID NO: 5) durante 3 días. Dos días después de la transducción, las células se trataron con o sin ácido zoledrónico 1 uM. Después de 24 horas, 5 las células THP-1 transducidas se cultivaron conjuntamente durante 4 horas con  $5 \times 10^5$  células PBMC e IL-2 en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Las células PBMC se estimularon previamente con ácido zoledrónico e IL-2 durante 11 días para expandir linfocitos V $\gamma$ 9V $\delta$ 2. Después de la tinción de V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 y TNF- $\alpha$  usando un anticuerpo anti 10 TCR-V $\delta$ 2 y anti TNF- $\alpha$  conjugado con fluoróforo, las células se analizaron mediante citometría de flujo. Se escogieron las células vivas y las células V $\delta$ 2+ y TNF- $\alpha$ + se seleccionaron en una transferencia puntual. Los linfocitos T citotóxicos 15 V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 activados aparecieron en el cuadrante superior derecho de los citogramas de flujo. Sin ácido zoledrónico, LV-control estimuló un 0,2 % de linfocitos T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 que expresaban TNF- $\alpha$  y LV-miR30 FDPS estimuló un 8,1 %. Con tratamiento de ácido zoledrónico, LV-control estimuló un 5,3 % de linfocitos T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 que expresaban TNF- $\alpha$  y LV-miR30 FDPS n.º 1 (SEQ ID NO: 5) estimularon un 67,3 %.

**15 Ejemplo 9: Relaciones E:D resultantes de una mezcla de células THP-1, linfocitos T GD humanos cultivados y/o Zometa (Zol)**

Este Ejemplo demuestra los resultados de mezclar células tumorales monocitoides THP-1 tratadas con linfocitos T GD humanos cultivados, como se muestra en la figura 11.

20 La línea celular monocitoide THP-1 se trató con un vector lentivírico de control (LV), un LV que suprime la expresión génica de la farnesil difosfato sintasa (LV-FDPS), ácido zoledrónico (Zol) o combinaciones. La leyenda, como se muestra en la figura 11, era: vectores lentivíricos de control (LV-Control), vectores lentivíricos que expresan microARN para reprimir FDPS (LV-FPPS), Zometa (Zol), Zometa más control lentivírico (Zol+LV-Control), o Zometa más vectores 25 lentivíricos que expresan microARN para reprimir la FPPS (Zol+LV-FPPS).

30 Se cultivaron linfocitos T GD humanos de un donante anónimo y se añadieron a células THP-1 tratadas en relaciones de 4:1, 2:1 o 1:1 (T GD:THP-1) durante 4 horas. La destrucción celular se midió mediante un ensayo de fluorescencia. Cuando las células THP-1 se trataron con una combinación de LV-FDPS y Zol, la destrucción de linfocitos T citotóxicos por parte de los linfocitos T GD aumentó enormemente en comparación con cualquiera de los tratamientos solos. Cuando el tratamiento con LV-FDPS solo se comparó con el tratamiento con Zol solo, el LV-FDPS condujo a una mayor destrucción, pero fue >3 veces inferior a la destrucción de células tumorales después del tratamiento combinado. El tratamiento combinado de LV-FDPS más Zol causó casi un 70 % de destrucción de células tumorales 35 con una relación de 4:1; esto fue más de 3 veces mayor que el segundo mejor tratamiento (LV-FDPS solo).

**35 Ejemplo 10 - Interferencia de ARN basado en ARNhC suministrado por lentivirus dirigida al gen de la farnesil difosfato sintasa (FDPS) humana**

40 Se infectaron células de carcinoma hepatocelular humano HepG2 con vectores lentivíricos que contenían el promotor H1 y una secuencia de ARNhC de FDPS no dirigida o cuatro diferentes, como se muestra en la figura 12. Después de 48 horas, se extrajo el ARN de las células y se convirtió en ADNc. La expresión del ADNc de FDPS se determinó mediante PCR cuantitativa usando cebadores SYBR Green y FDPS. La expresión de FDPS se normalizó a los niveles de actina para cada muestra.

45 Los vectores lentivíricos dirigidos a FDPS que contienen el promotor H1 y una secuencia no dirigida (5'-GCCGCTTGAGGATAGAGCTCGAGCTCATCCTACAAAGCGGCTTTT-3') (SEQ ID NO: 60) o una de las cuatro secuencias diferentes de ARNhC de FDPS

GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGGACTTTT

(Secuencia de ARNhC n.º 1 de FDPS; SEQ ID NO: 1);

50 GCAGGATTTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCTGCTTTT

(Secuencia de ARNhC n.º 2 de FDPS; SEQ ID NO: 2);

GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCCTGCCATGTACATGGCTTTT

(Secuencia de ARNhC n.º 3 de FDPS; SEQ ID NO: 3);

55 y

GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT

(Secuencia de ARNhC n.º 4 de FDPS; SEQ ID NO: 4)

se produjeron en linfocitos T 293.

A continuación, se infectaron células de carcinoma hepatocelular humano HepG2 con vectores lentivíricos para determinar la eficacia de la atenuación de FDPS. Después de 48 horas, se extrajo el ARN de las células usando el kit de aislamiento de ARN RNeasy (Qiagen) y se convirtió en ADNc con el kit de síntesis de ADNc SuperScript VILO (Thermo Scientific). La expresión del ADNc de FDPS se determinó mediante PCR cuantitativa en una máquina de qPCR Applied Biosystems StepOne usando una mezcla de PCR SYBR Green (Thermo Scientific) y cebadores FDPS (cebador directo: 5'-AGGAATTGATGGCGAGAAGG-3' (SEQ ID NO: 61) y cebador inverso: 5'-CCCAAAGAGGTCAAGGTAATCA-3' (SEQ ID NO: 62)). La expresión de FDPS se normalizó a niveles de actina para cada muestra usando los cebadores de actina (cebador directo: 5'-AGCGCGGCTACAGCTTCA-3' (SEQ ID NO: 63) y cebador inverso: 5'-GGCGACGTAGCACAGCTTCT-3' (SEQ ID NO: 64)). La expresión relativa de ARN de FDPS de la muestra de shCon se establece en 100 %. Hubo una disminución del 85 % (secuencia n.º 1 de FDPS), 89 % (secuencia n.º 2 de FDPS), 46 % (secuencia n.º 3 de FDPS) y 98 % (secuencia n.º 4 de FDPS) en la expresión de FDPS.

**15 Ejemplo 11 - Interferencia de ARN basado en miR suministrado por lentivirus dirigida al gen de la farnesil difosfato sintasa (FDPS) humana**

Como se muestra en la figura 13, se infectaron células de carcinoma hepatocelular humano HepG2 con vectores lentivíricos que contenían el promotor H1 (SEQ ID NO: 16) y la secuencia de ARNhC n.º 4 de FDPS (SEQ ID NO: 4) o el promotor EF-1α (SEQ ID NO: 41) y las secuencias de FDPS basadas en miR30. Después de 48 horas, las células se lisaron y se realizó una inmunotransferencia usando un anticuerpo anti FDPS (Thermo Scientific) y anti actina (Sigma) como control de carga de proteínas.

Más específicamente, se infectaron células de carcinoma hepatocelular humano HepG2 con vectores lentivíricos que contenían el promotor H1 (SEQ ID NO: 16) y la secuencia de ARNhC de FDPS GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTGAGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCTTTT (secuencia de ARNhC n.º 4 de FDPS; SEQ ID NO: 4) o el promotor EF-1alfa (SEQ ID NO: 41) y secuencias de FDPS basadas en miR30

```
AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAA  
GCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCCTGCCTACTGCCTCGGACTTCA  
AGGGCCT (Secuencia n.º 3 de miR30 FDPS; SEQ ID NO: 5)
```

30 y

```
AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAA  
GCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCCTGCCTACTGCCTCGGACTTCAAG  
GGGCT (Secuencia n.º 2 de miR30 FDPS; SEQ ID NO: 6).
```

35 Después de 48 horas, las células se lisaron con tampón de lisis NP-40 y la proteína se cuantificó con el reactivo de ensayo de proteínas Bio-Rad. Se sometieron a electroforesis muestras de proteínas a 50 microgramos en geles de Bis-Tris al 4-12 % (Thermo Scientific) y se transfirieron a membranas de PVDF (EMD Millipore). Se realizó una inmunotransferencia usando un anticuerpo anti FDPS (Thermo Scientific) y anti actina (Sigma) como control de carga de proteínas. Los anticuerpos se unieron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP y se detectaron con un escáner Licor c-DiGit Blot usando el reactivo Immobilon Western ECL (EMD Millipore). La densitometría de las bandas de inmunotransferencia se cuantificó con el programa informático de imágenes NIH. El LV control con el promotor EF-1 se estableció en el 100 %. Hubo una reducción del 68 % (LV-shFDPS n.º 4), 43 % (LV-miR FDPS n.º 1) y 38 % (LV-miR FDPS n.º 3) de la expresión de proteínas de FDPS.

**45 Ejemplo 12 - Atenuación de FDPS durante 3 días en células de carcinoma de hígado HepG2 mediante ARNhC n.º 4 de FDPS que expresa virus adenoasociado (AAV)**

Este ejemplo ilustra que la atenuación de FDPS durante 3 días en células de carcinoma de hígado HepG2 mediante el ARNhC n.º 4 (SEQ ID NO: 4) de FDPS que expresa virus adenoasociado (AAV) estimula la expresión de TNF-α en linfocitos T GD (figura 14, Panel B).

50 Se transdijeron células HepG2 con control o ARNhC n.º 4 (SEQ ID NO: 8) de AAV-FDPS durante 3 días. Dos días después de la transducción, las células se trataron con o sin ácido zoledrónico 1 uM. Después de 24 horas, las células HepG2 transducidas se cultivaron conjuntamente durante 4 horas con  $5 \times 10^5$  células PBMC e IL-2 en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Las células PBMC se estimularon previamente con ácido zoledrónico e IL-2 durante 11 días para expandir linfocitos T Vy9Vδ2. Después de la tinción de Vy9Vδ2 y TNF-α usando un anticuerpo anti TCR-Vδ2 y anti TNF-α conjugado con fluoróforo, las células se analizaron mediante citometría de flujo. Se escogieron las células vivas y las células Vδ2+ y TNF-α+ se seleccionaron en una transferencia puntual. Los linfocitos T citotóxicos Vy9Vδ2 activados aparecieron en el cuadrante superior derecho de los citogramas de flujo (figura 14, Panel B).

*Construcción del vector AAV.* Se insertó una secuencia de ARNhc n.º 4 (SEQ ID NO: 4) de FDPS en el plásmido pAAV (Cell Biolabs). Las secuencias de oligonucleótidos de FDPS que contenían sitios de restricción BamHI y EcoRI se sintetizaron por Eurofins MWG Operon. Las secuencias de oligonucleótidos codificante y no codificantes solapantes se mezclaron y se hibridaron durante enfriamiento de 70 grados centígrados a temperatura ambiente. El pAAV se digirió con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI durante una hora a 37 grados centígrados. El plásmido pAAV digerido se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa y se extrajo del gel usando un kit de extracción de ADN en gel de Thermo Scientific. Se determinaron las concentraciones de ADN y se mezclaron el vector y el oligo (relación 3:1), se permitió la hibridación y se ligaron. La reacción de ligadura se realizó con ADN ligasa de T4 durante 30 minutos a temperatura ambiente. A 25 microlitros de células bacterianas competentes STBL3, se añadieron 2,5 microlitros de la mezcla de ligadura. La transformación se logró después de un choque térmico a 42 grados centígrados. Las células bacterianas se diseminaron en placas de agar que contenían ampicilina y las colonias resistentes a fármaco (que indicaban la presencia de plásmidos resistentes a ampicilina) se recuperaron y se expandieron en caldo LB. Para comprobar la inserción de las oligosecuencias, el ADN plasmídico se extrajo de cultivos bacterianos recogidos con el kit mini prep de ADN de Thermo Scientific. La inserción de secuencias de ARNhc en el plásmido pAAV se verificó mediante secuenciación de ADN usando un cebador específico para el promotor usado para regular la expresión de ARNhc. Un vector AAV ilustrativo con un promotor H1 (SEQ ID NO: 16), secuencia shFDPS (por ejemplo, SEQ ID NO: 4), repetición terminal invertida izquierda (ITR izquierda; SEQ ID NO: 65) y repetición terminal invertida derecha (ITR derecha; SEQ ID NO: 66) se pueden encontrar en la figura 14, Panel A).

*Producción de partículas de AAV.* El plásmido de ARNhc de AAV-FDPS se combinó con los plásmidos pAAV-RC2 (Cell Biolabs) y pAuxiliar (Cell Biolabs). El plásmido pAAV-RC2 contiene los genes de la cápside Rep y AAV2 y el pAuxiliar contiene los genes E2A, E4 y VA de adenovirus. Para producir partículas de AAV, estos plásmidos se transfecionaron en una relación de 1:1:1 (pAAV-shFDPS: pAAV-RC2: pAuxiliar) en linfocitos 293T. Para la transfección de células en placas de 150 mm (BD Falcon), se añadieron 10 microgramos de cada plásmido en 1 ml de DMEM. En otro tubo, se añadieron 60 microlitros del reactivo de transfección PEI (1 microgramo/ml) (Polysciences) a 1 ml de DMEM. Se mezclaron los dos tubos y se dejaron incubar durante 15 minutos. A continuación, la mezcla de transfección se añadió a las células y las células se recogieron después de 3 días. Las células se lisaron mediante lisis por congelación/descongelación en hielo seco/isopropanol. Se añadió benzonasa nucleasa (Sigma) al lisado celular durante 30 minutos a 37 grados centígrados. A continuación, se sedimentaron los restos celulares mediante centrifugación a 4 grados centígrados durante 15 minutos a 12.000 rpm. El sobrenadante se recogió y a continuación se añadió a las células diana.

### **Ejemplo 13 - Disminución de la prenilación de RAP1 en las células transducidas con LV-shFDPS y tratadas con ácido zoledrónico**

Este ejemplo ilustra que el ARNhc suministrado por lentivirus dirigido al gen de la farnesil difosfato sintasa (FDPS) humana y el ácido zoledrónico se sinergizan para inhibir la producción de farnesil difosfato.

FDPS es una enzima en la vía de síntesis de isoprenoïdes que cataliza la producción de difosfato de farnesilo. La inhibición de la actividad enzimática de FDPS mediante ácido zoledrónico o la reducción de la expresión de proteínas mediante la atenuación mediada por ARNhc darán como resultado niveles reducidos de difosfato de farnesilo. La farnesilación de proteínas celulares requiere difosfato de farnesilo. RAP1A es una proteína modificada por farnesilación, que puede usarse como biomarcador de los niveles de difosfato de farnesilo celular. Se usó un anticuerpo que reconoce específicamente la farnesilación reducida de RAP1A para medir la actividad de FDPS después de la transducción con LV-shFDPS sola o en combinación con ácido zoledrónico. Se infectaron células de carcinoma hepatocelular humano HepG2 con vectores lentivíricos que contenían la secuencia de ARNhc n.º 4 de FDPS. Para las células tratadas con ácido zoledrónico, se añadió ácido zoledrónico (Sigma) durante las últimas 24 horas. Después de 48 horas, las células se lisaron con tampón de lisis NP-40 y la proteína se cuantificó con el reactivo de ensayo de proteínas Bio-Rad. Se sometieron a electroforesis muestras de proteínas a 50 microgramos en geles de Bis-Tris al 4-12 % (Thermo Scientific) y se transfirieron a membranas de PVDF (EMD Millipore). Se realizó una inmunotransferencia usando un anticuerpo anti FDPS (Thermo Scientific), anti RAP1A (Santa Cruz) y anti actina (Sigma) como control de carga de proteínas. Los anticuerpos se unieron con anticuerpos secundarios conjugados con HRP y se detectaron con un escáner Licor c-Digit Blot usando el reactivo Immobilon Western ECL (EMD Millipore). Un aumento en la intensidad de la banda de RAP1A se correlaciona con una farnesilación reducida. La desfarnesilación de RAP1A se produjo sólo en las células transducidas con LV-shFDPS y tratadas con ácido zoledrónico.

### **Ejemplo 14 - Tratamiento de un sujeto con cáncer**

*LV-FDPS es un medicamento genético suministrado por un vector lentivírico mediante administración local en el lugar del carcinoma hepatocelular no resecable en estadio tardío*

Un ensayo clínico de Fase I ensayará la seguridad y viabilidad de suministrar LV-FDPS al lugar del carcinoma hepatocelular (HCC) usando canulación del hígado guiada por ultrasonido en pacientes sin radioterapia o quimioterapia concomitantes. Se predice razonablemente que este estudio dará como resultado un tratamiento exitoso

del HCC. El estudio es un estudio sin enmascaramiento, con un aumento de dosis de 4 x 3 (4 intervalos de dosis, hasta 3 sujetos por dosis) para identificar la dosis máxima tolerable de LV-FDPS en pacientes de 18 años o más con HCC no resecable en estadio III/IV.

- 5 LV-FDPS es una terapia genética diseñada para reducir la expresión en células tumorales de la enzima farnesil difosfato sintasa. Los estudios experimentales muestran que las células tumorales modificadas por LV-FDPS inducen la actividad antitumoral de los linfocitos T gamma delta humanos, incluyendo la capacidad de destruir tumores mediante citotoxicidad celular.
- 10 Los sujetos con lesiones diana  $\geq 1$  cm de diámetro más largo (medidas mediante TC helicoidal) y  $\leq 4,9$  cm de diámetro máximo y que cumplen los criterios de inclusión y exclusión detallados a continuación, se inscriben en la siguiente categoría de dosificación disponible. Se inscriben un máximo de 3 sujetos para cada grupo de dosificación. La dosis es el número de unidades transductoras de LV-FDPS como se describe en los criterios de liberación del producto, suministradas mediante canulación intrahepática en un solo bolo con un volumen que no excederá de 25 ml. La dosis mínima es  $1 \times 10^9$  unidades transductoras y el aumento es 10 veces hasta la siguiente dosis de  $1 \times 10^{10}$  unidades transductoras, la siguiente dosis es  $1 \times 10^{11}$  unidades transductoras y una dosis máxima de  $1 \times 10^{12}$  unidades transductoras basándose en la experiencia informada con terapia de adenovirus recombinante para HCC (Sangro *et al.*, A phase I clinic trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular carcinoma, 2010, Cancer Gene Ther. 17:837-43). Los sujetos se inscriben, se tratan y se evalúan durante 3 meses. Todas las evaluaciones de seguridad se completan para cada grupo antes de inscribir y tratar a los sujetos en el siguiente nivel de dosis más alta. La inscripción y el aumento de dosis continúan hasta que se alcanza una dosis máxima tolerable o se finaliza el estudio.
- 15
- 20
- 25 La canulación se realiza a través de la arteria subclavia izquierda hasta que la punta del catéter esté en la unión adecuada de la arteria hepática. La canulación se guía por ecografía como se describe (Lin *et al.*, Clinical effects of intra-arterial infusion chemotherapy with cisplatin, mitomycin C, leucovor and 5-Fluorouracil for unresectable advanced hepatocellular carcinoma, 2004, J. Chin. Med. Assoc. 67:602-10).

#### ***Medidas de los resultados principales***

- 30 Seguridad: Los acontecimientos adversos sistémicos y locorregionales se clasifican según CTCAS y se codifican según MedRA. Los datos de acontecimientos adversos para todos los sujetos en un intervalo de dosis única se evaluarán antes del aumento de dosis. La evaluación final de seguridad incorpora datos de todos los intervalos de dosis.
- 35

#### ***Medidas de los resultados secundarios***

- Distribución de la lesión y retención de LV-FDPS después de la administración locorregional y posterior biopsia o necropsia para obtener tejidos.
- Tasa de respuesta objetiva (ORR) en lesiones no locales diana y medibles (si están presentes) mediante análisis físico, imágenes médicas o biopsia durante los 3 meses posteriores al tratamiento.
- Niveles de LV-FDPS en el torrente sanguíneo durante 10 minutos, 30 minutos, 1 hora y 1 día después de la inyección local.
- Cambios en los marcadores de la función hepática, incluyendo ALP, ALT, ASAT, bilirrubina total y GGT durante los 3 meses posteriores al tratamiento.
- Pacientes con supervivencia libre de enfermedad más allá del control histórico (sin LV-FDPS) en un análisis *ad hoc*.

#### ***Criterios de inclusión***

- 50
- Mayores de 18 años e incluyendo tanto hombres como mujeres.
  - Diagnóstico confirmado por histología o citología o basado en estándares clínicos actualmente aceptados de carcinoma hepatocelular de origen de células parenquimatosas que no es susceptible, en el momento de la selección, de resección, trasplante u otras terapias potencialmente curativas.
  - El médico tratante determina que la lesión es susceptible de suministro locorregional dirigido.
  - La lesión diana debe representar una enfermedad medible con un diámetro más largo unidimensional de  $\geq 1,0$  cm mediante tomografía computarizada; el diámetro máximo más largo es  $\leq 5,0$  cm.
  - Puntuación del rendimiento de Karnofsky del 60-80 % de los valores ECOG.
  - Esperanza de vida  $\geq 12$  semanas.
  - Función hematopoyética: WBC  $\geq 2.500/\text{mm}^3$ ; ANC  $\geq 1000/\text{mm}^3$ ; Hemoglobina  $\geq 8\text{ g/dl}$ ; Recuento de plaquetas  $\geq 50.000/\text{mm}^3$ ; Coagulación INR  $\leq 1,3$ .
  - AST y ALT  $<5$  veces el LSN; ALPS  $<5$  veces el LSN. Bilirrubina  $\leq 1,5$  veces el LSV; Creatina  $\leq 1,5$  veces el LSN y eGFR  $\geq 50$ .
  - Función tiroidea: T3 total o T3 libre, T4 total o T4 libre y THC  $\leq$  CTCAE Anomalía de grado 2.
  - Función renal, cardiovascular y respiratoria adecuadas a criterio del médico tratante.
  - Función inmunitaria: Linfocitos T Vgamma9Vdelta2+ circulantes  $\geq 30/\text{mm}^3$ ; ninguna enfermedad de

inmunodeficiencia.

- Negativo para HIV mediante serología y prueba de ARN vírico.
- Consentimiento informado por escrito.

##### 5 Criterios de exclusión

- Lesión diana contigua a, que abarca o infiltra un vaso sanguíneo.
- HCC primario susceptible de resección, trasplante u otras terapias potencialmente curativas.
- Cirugía hepática o quimioembolización en los últimos 4 meses.
- 10 • Radiación hepática o radioterapia de cuerpo entero en los últimos 4 meses.
- Quimioterapia con 4 semanas o cualquier uso de nitrosourea, mitomicina C o cisplatino.
- Recepción actual o en las últimas 4 semanas de terapia con aminobisfosfonato
- Agentes en investigación en las últimas 4 semanas o <5 semividas del fármaco.
- 15 • Deterioro de la cicatrización de heridas debido a la diabetes.
- Enfermedad psiquiátrica importante, dependencia del alcohol o consumo de drogas ilícitas.
- Reticencia a cumplir con los protocolos del estudio y los requisitos de presentación de informes.
- Tratamiento con aminobisfosfonato en los últimos 4 meses.
- 20 • Presencia de trastornos cardiovasculares, cerebrovasculares (apoplejía), inmunitarios (excepto infección por el virus de la hepatitis B o C, hepatitis vírica o cirrosis), endocrinos o del sistema nervioso central clínicamente significativos; encefalopatía actual; sangrado por varices que haya requerido hospitalización o transfusión en los últimos 4 meses.
- Antecedentes de HIV o síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
- Tratamiento actual o previo con medicamentos antirretrovíricos.
- 25 • Embarazo, lactancia o negativa a adoptar el uso de anticonceptivos químicos o de barrera durante el ensayo y el intervalo de seguimiento.

***LV-FDPS es un medicamento genético suministrado por un vector lentivírico mediante administración local en el lugar del carcinoma hepatocelular no resecable en estadio tardío - Administración complementaria de aminobisfosfonato***

30 Un ensayo clínico de Fase I ensayará la seguridad y viabilidad de suministrar LV-FDPS al lugar del carcinoma hepatocelular (HCC) usando canulación del hígado guiada por ultrasonido en pacientes con quimioterapia concomitante con aminobisfosfonato. Se predice racionalmente que este estudio dará como resultado un tratamiento exitoso del HCC. El estudio es un estudio sin enmascaramiento, con un aumento de dosis de 4 x 3 (4 intervalos de dosis, hasta 3 sujetos por dosis) para identificar la dosis máxima tolerable de LV-FDPS en pacientes de 18 años o más con HCC no resecable en estadio III/IV.

40 LV-FDPS es una terapia genética diseñada para reducir la expresión en células tumorales de la enzima farnesil difosfato sintasa. Los estudios experimentales muestran que las células tumorales modificadas por LV-FDPS inducen la actividad antitumoral de los linfocitos T gamma delta humanos, incluyendo la capacidad de destruir tumores mediante citotoxicidad celular. Los estudios experimentales anteriores también mostraron el potencial de interacciones positivas entre LV-FDPS y fármacos de aminobisfosfonato específicos que pueden prescribirse en enfermedades primarias o metastásicas. Para este estudio, los sujetos recibirán dosis crecientes de LV-FDPS con una dosis de tratamiento de referencia continua con Aredia® (pamidronato), Zometa® (ácido zoledrónico) o Actonel® (risedronato) según el consejo del médico y la preferencia del sujeto.

50 Los sujetos con lesiones diana ≥1 cm de diámetro más largo (medidas mediante TC helicoidal) y ≤4,9 cm de diámetro máximo y que cumplen los criterios de inclusión y exclusión detallados a continuación, se inscriben y comienzan con la terapia con aminobisfosfonato. 30 días después, se evalúa de nuevo el tamaño de la lesión diana para garantizar que los sujetos aún cumplen con los criterios iniciales para LV-FDPS. Los sujetos sin respuesta clínica objetiva al aminobisfosfonato se inscriben en la siguiente categoría de dosificación disponible de LV-FDPS. Se inscriben un máximo de 3 sujetos para cada grupo de dosificación y todos continúan con aminobisfosfonato durante la duración del estudio, a menos que el médico tratante indique lo contrario. La dosis de LV-FDPS es el número de unidades transductoras de LV-FDPS como se describe en los criterios de liberación del producto, suministradas mediante canulación intrahepática en un solo bolo con un volumen que no excederá de 25 ml. La dosis mínima es 1 x 10<sup>9</sup> unidades transductoras y el aumento es 10 veces hasta la siguiente dosis de 1 x 10<sup>10</sup> unidades transductoras, la siguiente dosis es 1 x 10<sup>11</sup> unidades transductoras y una dosis máxima de 1 x 10<sup>12</sup> unidades transductoras basándose en la experiencia informada con terapia de adenovirus recombinante para HCC (Sangro *et al.*, A phase I clinic trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular carcinoma, 2010, Cancer Gene Ther. 17:837-43).

55 60 Los sujetos se inscriben, se tratan y se evalúan durante 3 meses. Todas las evaluaciones de seguridad se completan para cada grupo antes de inscribir y tratar a los sujetos en el siguiente nivel de dosis más alta. La inscripción y el aumento de dosis continúan hasta que se alcanza una dosis máxima tolerable o se finaliza el estudio.

65 La canulación se realiza a través de la arteria subclavia izquierda hasta que la punta del catéter esté en la unión adecuada de la arteria hepática. La canulación se guía por ecografía como se describe (Lin *et al.*, Clinical effects of intra-arterial infusion chemotherapy with cisplatin, mitomycin C, leucovor and 5-Fluorouracil for unresectable advanced

hepatocellular carcinoma, 2004, J. Chin. Med. Assoc. 67:602-10).

#### ***Medidas de los resultados principales***

- 5 Seguridad: Los acontecimientos adversos sistémicos y locorregionales se clasifican según CTCAS y se codifican según MedRA. Los datos de acontecimientos adversos para todos los sujetos en un intervalo de dosis única se evaluarán antes del aumento de dosis. La evaluación final de seguridad incorpora datos de todos los intervalos de dosis.

10 ***Medidas de los resultados secundarios***

- Distribución de la lesión y retención de LV-FDPS después de la administración locorregional y posterior biopsia o necropsia para obtener tejidos.
- Tasa de respuesta objetiva (ORR) en lesiones no locales diana y medibles (si están presentes) mediante análisis físico, imágenes médicas o biopsia durante los 3 meses posteriores al tratamiento.
- Niveles de LV-FDPS en el torrente sanguíneo durante 10 minutos, 30 minutos, 1 hora y 1 día después de la inyección local.
- Cambios en los marcadores de la función hepática, incluyendo ALP, ALT, ASAT, bilirrubina total y GGT durante los 3 meses posteriores al tratamiento.
- 20 • Pacientes con supervivencia libre de enfermedad más allá del control histórico (sin LV-FDPS) en un análisis *ad hoc*.

#### ***Criterios de inclusión***

- 25 • Mayores de 18 años e incluyendo tanto hombres como mujeres.
- Diagnóstico confirmado por histología o citología o basado en estándares clínicos actualmente aceptados de carcinoma hepatocelular de origen de células parenquimatosas que no es susceptible, en el momento de la selección, de resección, trasplante u otras terapias potencialmente curativas.
- 30 • El médico tratante determina que la lesión es susceptible de suministro locorregional dirigido.
- La lesión diana debe representar una enfermedad medible con un diámetro más largo unidimensional de  $\geq 1,0$  cm mediante tomografía computarizada; el diámetro máximo más largo es  $\leq 5,0$  cm.
- Puntuación del rendimiento de Karnofsky del 60-80 % de los valores ECOG.
- Esperanza de vida  $\geq 12$  semanas.
- 35 • Función hematopoyética: WBC  $\geq 2.500/\text{mm}^3$ ; ANC  $\geq 1000/\text{mm}^3$ ; Hemoglobina  $\geq 8\text{ g/dl}$ ; Recuento de plaquetas  $\geq 50.000/\text{mm}^3$ ; Coagulación INR  $\leq 1,3$ .
- AST y ALT  $<5$  veces el LSN; ALPS  $<5$  veces el LSN. Bilirrubina  $\leq 1,5$  veces el LSV; Creatina  $\leq 1,5$  veces el LSN y eGFR  $\geq 50$ .
- 40 • Función tiroidea: T3 total o T3 libre, T4 total o T4 libre y THC  $\leq$  CTCAE Anomalía de grado 2.
- Función renal, cardiovascular y respiratoria adecuadas a criterio del médico tratante.
- Función inmunitaria: Linfocitos T Vgamma9Vdelta2+ circulantes  $\geq 30/\text{mm}^3$ ; ninguna enfermedad de inmunodeficiencia.
- Negativo para HIV mediante serología y prueba de ARN vírico.
- Consentimiento informado por escrito.

45 ***Criterios de exclusión***

- Intolerancia o reticencia a continuar con la terapia complementaria con aminobisfosfonato.
- Respuesta clínica objetiva después de la terapia con aminobisfosfonato.
- Lesión diana contigua a, que abarca o infiltra un vaso sanguíneo.
- 50 • HCC primario susceptible de resección, trasplante u otras terapias potencialmente curativas.
- Cirugía hepática o quimoembolización en los últimos 4 meses.
- Radiación hepática o radioterapia de cuerpo entero en los últimos 4 meses.
- Quimioterapia, excluyendo aminobisfosfonato, en las 4 semanas anteriores o cualquier uso de nitrosourea, mitomicina C o cisplatino.
- 55 • Agentes en investigación en las últimas 4 semanas o  $<5$  semividas del fármaco.
- Deterioro de la cicatrización de heridas debido a la diabetes.
- Enfermedad psiquiátrica importante, dependencia del alcohol o consumo de drogas ilícitas.
- Reticencia a cumplir con los protocolos del estudio y los requisitos de presentación de informes.
- 60 • Presencia de trastornos cardiovasculares, cerebrovasculares (apoplejía), inmunitarios (excepto infección por el virus de la hepatitis B o C, hepatitis vírica o cirrosis), endocrinos o del sistema nervioso central clínicamente significativos; encefalopatía actual; sangrado por varices que haya requerido hospitalización o transfusión en los últimos 4 meses.
- Antecedentes de HIV o síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
- Tratamiento actual o previo con medicamentos antirretrovíricos.
- 65 • Embarazo, lactancia o negativa a adoptar el uso de anticonceptivos químicos o de barrera durante el ensayo y el intervalo de seguimiento.

**Ejemplo 15 - Tratamiento de un sujeto con una o más enfermedades víricas crónicas del hígado LV-FDPS es un medicamento genético suministrado por un vector lentivírico mediante administración local al hígado para el tratamiento del virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, HIV u otra infección vírica del hígado**

5 Un ensayo clínico de Fase I ensayará la seguridad y viabilidad de suministrar LV-FDPS al hígado infectado víricamente usando canulación guiada por ultrasonido. Se predice razonablemente que este estudio dará como resultado el tratamiento exitoso de las infecciones del hígado. El estudio es un estudio sin enmascaramiento, con aumento de dosis de 4 x 3 (4 intervalos de dosis, hasta 3 sujetos por dosis) para identificar la dosis máxima tolerable de LV-FDPS en pacientes de 18 años o más con enfermedad vírica crónica del hígado resistente a la quimioterapia.

10 15 LV-FDPS es una terapia genética diseñada para reducir la expresión en células tumorales de la enzima farnesil difosfato sintasa. Los estudios experimentales muestran que las células tumorales modificadas por LV-FDPS inducen linfocitos T gamma delta humanos, incluyendo una capacidad de citotoxicidad celular contra células infectadas por virus.

20 Los sujetos con infección vírica confirmada del hígado, incluyendo el virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, HIV u otros virus, se inscriben en la siguiente categoría de dosificación de LV-FDPS disponible. Se inscriben un máximo de 3 sujetos para cada grupo de dosificación. La dosis de LV-FDPS es el número de unidades transductoras de LV-FDPS como se describe en los criterios de liberación del producto, suministradas mediante canulación intrahepática en un solo bolo con un volumen que no excederá de 25 ml. La dosis mínima es  $1 \times 10^9$  unidades transductoras y el aumento es 10 veces hasta la siguiente dosis de  $1 \times 10^{10}$  unidades transductoras, la siguiente dosis es  $1 \times 10^{11}$  unidades transductoras y una dosis máxima de  $1 \times 10^{12}$  unidades transductoras basándose en la experiencia informada con terapia de adenovirus recombinante para HCC (Sangro *et al.*, A phase I clinic trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular carcinoma, 2010, Cancer Gene Ther. 17:837-43). Los sujetos se inscriben, se tratan y se evalúan durante 3 meses. Todas las evaluaciones de seguridad se completan para cada grupo antes de inscribir y tratar a los sujetos en el siguiente nivel de dosis más alta. La inscripción y el aumento de dosis continúan hasta que se alcanza una dosis máxima tolerable o se finaliza el estudio.

30 35 La canulación se realiza a través de la arteria subclavia izquierda hasta que la punta del catéter esté en la unión adecuada de la arteria hepática. La canulación se guía por ecografía como se describe (Lin *et al.*, Clinical effects of intra-arterial infusion chemotherapy with cisplatin, mitomycin C, leucovor and 5-Fluorouracil for unresectable advanced hepatocellular carcinoma, 2004, J. Chin. Med. Assoc. 67:602-10).

40 45 **Medidas de los resultados principales**

Seguridad: Los acontecimientos adversos sistémicos y locorregionales se clasifican según CTCAS y se codifican según MedRA. Los datos de acontecimientos adversos para todos los sujetos en un intervalo de dosis única se evaluarán antes del aumento de dosis. La evaluación final de seguridad incorpora datos de todos los intervalos de dosis.

50 55 **Medidas de los resultados secundarios**

- Distribución de la lesión y retención de LV-FDPS después de la administración locorregional y posterior biopsia o necropsia para obtener tejidos.
- Tasa de respuesta objetiva (ORR) medida como respuesta vírica sostenida (SVR, por sus siglas en inglés) dentro del órgano o sistémicamente durante los 3 meses posteriores al tratamiento.
- Niveles de LV-FDPS en el torrente sanguíneo durante 10 minutos, 30 minutos, 1 hora y 1 día después de la inyección local.
- Cambios en los marcadores de la función hepática, incluyendo ALP, ALT, ASAT, bilirrubina total y GGT durante los 3 meses posteriores al tratamiento.
- Pacientes con supervivencia libre de enfermedad más allá del control histórico (sin LV-FDPS) en un análisis *ad hoc*.

60 65 **Criterios de inclusión**

- Mayores de 18 años e incluyendo tanto hombres como mujeres.
- Diagnóstico confirmado por histología o citología o basado en estándares clínicos actualmente aceptados de infección vírica crónica del hígado que no es susceptible, en el momento de la selección, de resección, trasplante u otras terapias potencialmente curativas.
- El médico tratante determina que la lesión es susceptible de suministro locorregional dirigido.
- Puntuación del rendimiento de Karnofsky del 60-80 % de los valores ECOG.
- Esperanza de vida  $\geq 12$  semanas.
- Función hematopoyética: WBC  $\geq 2.500/\text{mm}^3$ ; ANC  $\geq 1000/\text{mm}^3$ ; Hemoglobina  $\geq 8\text{ g/dl}$ ; Recuento de plaquetas  $\geq 50.000/\text{mm}^3$ ; Coagulación INR  $\leq 1,3$ .
- AST y ALT <5 veces el LSN; ALPS <5 veces el LSN. Bilirrubina  $\leq 1,5$  veces el LSV; Creatina  $\leq 1,5$  veces el LSN y

eGFR  $\geq 50$ .

- Función tiroidea: T3 total o T3 libre, T4 total o T4 libre y THC  $\leq$  CTCAE Anomalía de grado 2.
- Función renal, cardiovascular y respiratoria adecuadas a criterio del médico tratante.
- Función inmunitaria: Linfocitos T Vgamma9Vdelta2+ circulantes  $\geq 30/\text{mm}^3$ ; ninguna enfermedad de inmunodeficiencia.
- Negativo para HIV mediante serología y prueba de ARN vírico.
- Consentimiento informado por escrito.

#### **Criterios de exclusión**

- 10 • Enfermedad vírica crónica susceptible de resección, trasplante u otras terapias potencialmente curativas.
- Cirugía hepática o quimioembolización en los últimos 4 meses.
- Radiación hepática o radioterapia de cuerpo entero en los últimos 4 meses.
- Agentes en investigación en las últimas 4 semanas o <5 semividas del fármaco.
- 15 • Recepción actual (en las últimas 4 semanas) o en curso de terapia con aminobisfosfonato.
- Deterioro de la cicatrización de heridas debido a la diabetes.
- Enfermedad psiquiátrica importante, dependencia del alcohol o consumo de drogas ilícitas.
- Reticencia a cumplir con los protocolos del estudio y los requisitos de presentación de informes.
- 20 • Presencia de trastornos cardiovasculares, cerebrovasculares (apoplejía), inmunitarios (excepto infección vírica, hepatitis vírica o cirrosis), endocrinos o del sistema nervioso central clínicamente significativos; encefalopatía actual; sangrado por varices que haya requerido hospitalización o transfusión en los últimos 4 meses.
- Embarazo, lactancia o negativa a adoptar el uso de anticonceptivos químicos o de barrera durante el ensayo y el intervalo de seguimiento.

#### **25 LV-FDPS es un medicamento genético suministrado por un vector lentivírico mediante administración local al hígado para el tratamiento del virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, HIV u otra infección vírica del hígado - terapia complementaria concomitante con aminobisfosfonato**

30 Un ensayo clínico de Fase I ensayará la seguridad y viabilidad de suministrar LV-FDPS al hígado infectado víricamente usando canulación guiada por ultrasonido. Se predice razonablemente que este estudio dará como resultado el tratamiento exitoso de las infecciones del hígado. El estudio es un estudio sin enmascaramiento, con aumento de dosis de 4 x 3 (4 intervalos de dosis, hasta 3 sujetos por dosis) para identificar la dosis máxima tolerable de LV-FDPS en pacientes de 18 años o más con enfermedad vírica crónica del hígado resistente a la quimioterapia.

35 LV-FDPS es una terapia genética diseñada para reducir la expresión en células tumorales de la enzima farnesil difosfato sintasa. Los estudios experimentales muestran que las células tumorales modificadas por LV-FDPS inducen linfocitos T gamma delta humanos, incluyendo una capacidad de citotoxicidad celular contra células infectadas por virus. Los estudios experimentales anteriores también mostraron el potencial de interacciones positivas entre LV-FDPS y fármacos de aminobisfosfonato específicos que pueden prescribirse durante una enfermedad infecciosa. Para este estudio, los sujetos recibirán dosis crecientes de LV-FDPS con una dosis de tratamiento de referencia continua con Aredia® (pamidronato), Zometa® (ácido zoledrónico) o Actonel® (risedronato) según el consejo del médico y la preferencia del sujeto.

45 Los sujetos con infección vírica confirmada del hígado, incluyendo el virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis C, HIV u otros virus, iniciarán la terapia con aminobisfosfonato durante 45 días antes de volver a realizar la selección para cumplir con los criterios de inscripción para el tratamiento de una enfermedad infecciosa con LV-FDPS. Los sujetos aptos se inscriben en la siguiente categoría de dosificación de LV-FDPS disponible. Se inscriben un máximo de 3 sujetos para cada grupo de dosificación. La dosis de LV-FDPS es el número de unidades transductoras de LV-FDPS como se describe en los criterios de liberación del producto, suministradas mediante canulación intrahepática en un solo bolo con un volumen que no excederá de 25 ml. La dosis mínima es  $1 \times 10^9$  unidades transductoras y el aumento es 10 veces hasta la siguiente dosis de  $1 \times 10^{10}$  unidades transductoras, la siguiente dosis es  $1 \times 10^{11}$  unidades transductoras y una dosis máxima de  $1 \times 10^{12}$  unidades transductoras basándose en la experiencia informada con terapia de adenovirus recombinante para HCC (Sangro *et al.*, A phase I clinic trial of thymidine kinase-based gene therapy in advanced hepatocellular carcinoma, 2010, Cancer Gene Ther. 17:837-43).

50 55 Los sujetos se inscriben, se tratan y se evalúan durante 3 meses. Todas las evaluaciones de seguridad se completan para cada grupo antes de inscribir y tratar a los sujetos en el siguiente nivel de dosis más alta. La inscripción y el aumento de dosis continúan hasta que se alcanza una dosis máxima tolerable o se finaliza el estudio.

60 La canulación se realiza a través de la arteria subclavia izquierda hasta que la punta del catéter esté en la unión adecuada de la arteria hepática. La canulación se guía por ecografía como se describe (Lin *et al.*, Clinical effects of intra-arterial infusion chemotherapy with cisplatin, mitomycin C, leucovor and 5-Fluorouracil for unresectable advanced hepatocellular carcinoma, 2004, J. Chin. Med. Assoc. 67:602-10).

#### **Medidas de los resultados principales**

65 Seguridad: Los acontecimientos adversos sistémicos y locoregionales se clasifican según CTCAS y se codifican

según MedRA. Los datos de acontecimientos adversos para todos los sujetos en un intervalo de dosis única se evaluarán antes del aumento de dosis. La evaluación final de seguridad incorpora datos de todos los intervalos de dosis.

#### 5 ***Medidas de los resultados secundarios***

- Distribución de la lesión y retención de LV-FDPS después de la administración locorregional y posterior biopsia o necropsia para obtener tejidos.
- Tasa de respuesta objetiva (ORR) medida como respuesta vírica sostenida (SVR, por sus siglas en inglés) dentro del órgano o sistémicamente durante los 3 meses posteriores al tratamiento.
- Niveles de LV-FDPS en el torrente sanguíneo durante 10 minutos, 30 minutos, 1 hora y 1 día después de la inyección local.
- Cambios en los marcadores de la función hepática, incluyendo ALP, ALT, ASAT, bilirrubina total y GGT durante los 3 meses posteriores al tratamiento.
- Pacientes con supervivencia libre de enfermedad más allá del control histórico (sin LV-FDPS) en un análisis *ad hoc*.

#### ***Criterios de inclusión***

- 20 • Mayores de 18 años e incluyendo tanto hombres como mujeres.
- Diagnóstico confirmado por histología o citología o basado en estándares clínicos actualmente aceptados de infección vírica crónica del hígado que no es susceptible, en el momento de la selección, de resección, trasplante u otras terapias potencialmente curativas.
- El médico tratante determina que la lesión es susceptible de suministro locorregional dirigido.
- 25 • Puntuación del rendimiento de Karnofsky del 60-80 % de los valores ECOG.
- Esperanza de vida ≥12 semanas.
- Función hematopoyética: WBC ≥2.500/mm<sup>3</sup>; ANC ≥1000/mm<sup>3</sup>; Hemoglobina ≥8 g/dl; Recuento de plaquetas ≥50.000/mm<sup>3</sup>; Coagulación INR ≤1,3.
- 30 • AST y ALT <5 veces el LSN; ALPS <5 veces el LSN. Bilirrubina ≤1,5 veces el LSV; Creatina ≤1,5 veces el LSN y eGFR ≥50.
- Función tiroidea: T3 total o T3 libre, T4 total o T4 libre y THC ≤CTCAE Anomalía de grado 2.
- Función renal, cardiovascular y respiratoria adecuadas a criterio del médico tratante.
- Función inmunitaria: Linfocitos T Vgamma9Vdelta2+ circulantes ≥30/mm<sup>3</sup>; ninguna enfermedad de inmunodeficiencia.
- 35 • Negativo para HIV mediante serología y prueba de ARN vírico.
- Consentimiento informado por escrito.

#### ***Criterios de exclusión***

- 40 • Enfermedad vírica crónica susceptible de resección, trasplante u otras terapias potencialmente curativas.
- Cirugía hepática o quimioembolización en los últimos 4 meses.
- Radiación hepática o radioterapia de cuerpo entero en los últimos 4 meses.
- Agentes en investigación en las últimas 4 semanas o <5 semividas del fármaco.
- Deterioro de la cicatrización de heridas debido a la diabetes.
- 45 • Enfermedad psiquiátrica importante, dependencia del alcohol o consumo de drogas ilícitas.
- Reticencia a cumplir con los protocolos del estudio y los requisitos de presentación de informes.
- Presencia de trastornos cardiovasculares, cerebrovasculares (apoplejía), inmunitarios (excepto infección vírica, hepatitis vírica o cirrosis), endocrinos o del sistema nervioso central clínicamente significativos; encefalopatía actual; sangrado por varices que haya requerido hospitalización o transfusión en los últimos 4 meses.
- 50 • Embarazo, lactancia o negativa a adoptar el uso de anticonceptivos químicos o de barrera durante el ensayo y el intervalo de seguimiento.

#### **Secuencias**

- 55 En el presente documento se hace referencia a las siguientes secuencias:

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
1	secuencia n. <sup>o</sup> 1 de ARNhc de FDPS	GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATT GTACTCCAGGACTTTT

(continuación)

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Descripción</b>	<b>Secuencia</b>
2	secuencia n.º 2 de ARNhc de FDPS	GCAGGATTTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGA ACGAAATCCTGCTTTT
3	secuencia n.º 2 de ARNhc de FDPS	GCAGGATTTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGA ACGAAATCCTGCTTTT
4	secuencia n.º 4 de ARNhc de FDPS	GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTC AGCCTCCTTCTGCTTTT
5	secuencia n.º 1 de miR30 de FDPS	AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCT CAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAA GGAGGCTGAGAAAGTGCCTGCCTACTGCCTCGGACTT CAAGGGGCT
6	secuencia n.º 2 de miR30 de FDPS	AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCT CAGCCTCCTTCTGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAA GGGCTGAGAAAGTGCCTGCCTACTGCCTCGGACTTCA AGGGGCT
7	secuencia n.º 3 de miR30 de FDPS	TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTCTCAGCCTCCTCT GCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAA AGTTGCCTACTGCCTCGGA
8	secuencia n.º 1 de miR155 de FDPS	CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTCT CAGCCTCCTTCTGCTTTGGCCACTGACTGAGCAGA AGGGCTGAGAAAGTCAGGACACAAGGCCTGTTACT AGCACTCA
9	secuencia n.º 1 de miR21 de FDPS	CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTGGGACTTCTC AGCCTCCTTCTGCCTGTTGAATCTCATGGCAGAAGG AGGCAGAGAAAGTCTGACATTGGTATCTTCATCT GACCA

# ES 2 965 357 T3

(continuación)

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Descripción</b>	<b>Secuencia</b>
10	secuencia n.º 1 de miR185 de FDPS	GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGGAGGGATACTTC TCAGCCTCCTCTGCTGGTCCCCTCCCCCAGAAGG AGGCTGAGAAAGTCCTCCCTCCAATGACCGCGTC TTCGTCG
11	promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV)	GTA GTCTT ATGCA ATA CTCTTG TAGTCTGCA ACAT GGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAG AGAAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAAAGTA AGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACA GACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAAT TGCCGCATTGCAGAGATATTGTATTAAAGTGCCTAG CTCGATACAATAAACG
12	repetición terminal larga (LTR) en el extremo 5'	GGTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGC TCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTC AATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTG CCCGTCTGTTGTGACTCTGGTA ACTAGAGATCCC TCAGACCCCTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCA
13	señal de empaquetamiento Psi	TACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGG AGAGAG
14	elemento de respuesta a Rev (RRE)	AGGAGCTTGTCCCTGGTTCTGGGAGCAGCAGG AAGCACTATGGCGCAGCCTCAATGACGCTGACGG TACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGC AGCAGAACAAATTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAA CAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGCATCAAG CAGCTCCAGGCAAGAACCTGGCTGTGGAAAGATA CCTAAAGGATCAACAGCTCC

(continuación)

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Descripción</b>	<b>Secuencia</b>
15	tramo central de polipurina (cPPT)	TTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTG CAGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGAC ATACAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAA ATTCAAAATTAA
16	promotores de ARNhc de la polimerasa III; promotor H1	GAACGCTGACGTCAACCCGCTCCAAGGAATCG CGGGCCCAGTGTCACTAGGCAGGAACACCCAGCGC GCGTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGAC AGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTGCATGTCGCTA TGTGTTCTGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCT TTGGATTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACC ACTT
17	secuencia de WPRE larga	AATCAACCTCTGATTACAAAATTGTGAAAGATTGA CTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTACGCTATG TGGATACGCTGCTTAATGCCTTGATCATGCTATT GCTTCCCGTATGGCTTCATTTCCTCCTGTATA AATCCTGGTGCTGTCCTTATGAGGAGTTGTC CCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGT TTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGCATTGCCA CCACCTGTCAGCTCCTTCCGGGACTTCGCTTCCC CCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTATGCCGCTG CCTTGGCGCTGCTGGACAGGGGCTGGCTGTGG CACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGAAATCATC GTCCTTCCTTGGCTGCTGCCGTGTTGCCACCTGG ATTCTGCGGGGACGTCTCTGCTACGTCCCTCG GCCCTCAATCCAGCGGACCTCCTCCCGCGCCTG CTGCCGGCTCTGCCCTCTCCCGCTTCCGCTTC GCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTGGGCCCT CCCCGCCT

(continuación)

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Descripción</b>	<b>Secuencia</b>
18	LTR delta en el extremo 3'	TGGAAGGGCTAATTCACTCCAACGAAGATAAGAT CTGCTTTGCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACC AGATCTGAGCCTGGGAGCTCTGGCTAACTAGGGA ACCCACTGCTTAAGCCTAATAAAGCTTGCGCTTGAG TGCTTCAGTAGTGTGTGCCGTCTGTTGTGACT CTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTAGTCAG TGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCA
19	plásmido auxiliar/Rev; promotor de la beta actina de pollo (CAG); transcripción	GCTATTACCATGGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTG CTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCCA ATTTGTATTATTATTATTAAATTATTGTGCAGC GATGGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGG CGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCG AGGCAGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGG CGCGCTCCGAAAGTTCCCTTATGGCGAGGCGCG GCGCGGCGGCCCTATAAAAGCGAAGCGCGCGC GGCG
20	plásmido auxiliar/Rev; Gag del HIV; cápside vírica	ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGA ATTAGATCGATGGGAAAAAAATCGGTTAAGGCCAG GGGGAAAGAAAAATATAAATTAAACATATAGTA TGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTGCGAGTTAA TCCTGGCCTGTTAGAACATCAGAAGGCTGTAGACA AATACTGGGACAGCTACAAACCATCCCTCAGACAG GATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAG CAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAA AAGACACCAAGGAAGCTTAGACAAGATAGAGGAA GAGCAAACAAAAGTAAGAAAAAAGCACAGCAAG CAGCAGCTGACACAGGACACAGCAATCAGGTAGC

## ES 2 965 357 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CAAAATTACCTATAAGTCAGAACATCCAGGGCA AATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACCTTAAA TGCATGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTC GCCAGAACGTGATAACCCTGTTTCAGCATTATCAG AAGGAGCCACCCCACAAGATTAAACACCATGCTA AACACAGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAAT GTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAAT GGGATAGAGTGCATCCAGTGCATGCAGGGCCTATT GCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGAAAGTGA CATAGCAGGAACACTAGTACCCCTCAGGAACAAA TAGGATGGATGACACATAATCCACCTATCCCAGTAG GAGAAATCTATAAAAGATGGATAATCCTGGGATTA AATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCATT CTGGACATAAGACAAGGACCAAAGGAACCCCTTAG AGACTATGTAGACCGATTCTATAAAACTCTAAGAGC CGAGCAAGCTTCACAAGAGGTAAAAATTGGATGA CAGAACCTTGTGGTCCAAAATGCGAACCCAGATT GTAAGACTATTTAAAAGCATTGGGACCAGGAGCG ACACTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGT GGGGGGACCCGGCCATAAGCAAGAGTTGGCTG AAGCAATGAGCCAAGTAACAAATCCAGCTACCATA ATGATACAGAAAGGCAATTAGGAACCAAAGAAA GACTGTTAAGTGTTCATTGTGGCAAAGAACGGCA CATGCCAAAATTGCAGGGCCCCTAGGAAAAAGG GCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGACACCAAATG AAAGATTGTACTGAGAGACAGGCTAATTAGGG AAGATCTGGCCTCCCACAAGGGAAGGCCAGGGAA TTTCTTCAGAGCAGACCAGAGCCAACAGCCCCACC AGAAGAGAGCTCAGGTTGGGAAGAGACAACAA CTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCGATAGACAAGGAA CTGTATCCTTAGCTCCCTCAGATCACTCTTGGCA GCGACCCCTCGTCACAATAA
21	plásmido auxiliar/Rev; HIV	ATGAATTGCCAGGAAGATGGAAACCAAAATGAT

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
	Pol; proteasa y transcriptasa inversa	AGGGGAATTGGAGGTTTATCAAAGTAGGACAGT ATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGACATAAA GCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTC AACATAATTGGAAGAAAICTGTTGACTCAGATTGGC TGCACCTTAAATTCCCATTAGTCCTATTGAGACTG TACCAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGATGGCCA AAAGTTAACAAATGCCATTGACAGAAGAAAAAT AAAAGCATTAGTAGAAATTGTACAGAAATGGAAA AGGAAGGAAAATTCAAAAATTGGCCTGAAAAT CCATACAATACTCCAGTATTGCCATAAAGAAAAA GACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTCAG AGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTCTGGGAAG TTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTTAAAC AGAAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGCGAT GCATATTTTCAGTTCCCTAGATAAAGACTTCAGG AACTACTGCATTACCATACCTAGTATAACAAAT GAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTT CCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCA GTGTAGCATGACAAAATCTAGAGCCTTTAGAAA ACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAATACATGGA TGATTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCA GCATAGAACAAAAATAGAGGAAC TGAGACAACATC TGTGAGGTGGGATTACCACACCAGACAAAGAAA CATCAGAAAGAACCTCCATTCCATTGGATGGTTAT GAACCTCCATCTGATAAAATGGACAGTACAGCCTATA GTGCTGCCAGAAAAGGACAGCTGGACTGTCAATGA CATACAGAAATTAGTGGAAAATTGAATTGGCAA GTCAGATTATGCAGGGATTAAAGTAAGGCAATTAT GTAAACTTCTAGGGAAACCAAAGCACTAACAGAA GTAGTACCACTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAACT GGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAAGAACCGGTAC ATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAGACTTAATAG CAGAAATACAGAACAGGGCAAGGCCAATGGACA

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		TATCAAATTATCAAGAGCCATTAAAAATCTGAAA ACAGGAAAATATGCAAGAATGAAGGGTGCCCACAC TAATGATGTGAAACAATTAAACAGAGGCAGTACAAA AAATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAG ACTCCTAAATTAAATTACCCATACAAAAGGAAACA TGGGAAGCATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCAC CTGGATTCCCTGAGTGGAGTTGTCAATAACCCCTCC CTTAGTGAAGTTATGGTACCACTAGTAGAGAAAGAAC CCATAATAGGAGCAGAAACTTCTATGTAGATGGG GCAGCCAATAGGGAAACTAAATTAGGAAAAGCAGG ATATGTAAC TGACAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCC CCCTAACGGACACAACAAATCAGAAGACTGAGTTA CAAGCAATTCACTAGCTTCAGGATTGGGATTAA GAAGTAAACATAGTGACAGACTCACAATATGCATT GGGAATCATTCAAGCACAACCAGATAAGAGTGAAAT CAGAGTTAGTCAGTCAAATAATAGAGCAGTTAATA AAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGTACCAAGC ACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGATG GGTGGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTA
22	plásmido auxiliar/Rev; integrasa del HIV; integración del ARN vírico	TTTTAGATGGAATAGATAAGGCCAAGAAGAAC TGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGGCTA GTGATTAACTACCACCTGTAGTAGCAAAAGAAA TAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAGGG GAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCCAGG AATATGGCAGCTAGATTGTACACATTAGAAGGAA AAGTTATCTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGAT ATATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCAGAGACAGGG CAAGAAACAGCATACTCCTCTTAAAATTAGCAGGA AGATGGCCAGTAAAACAGTACATACAGACAATGG CAGCAATTCAACCAGTACTACAGTTAAGGCCGCTG TTGGTGGCGGGGATCAAGCAGGAATTGGCATTCC CTACAATCCCCAAAGTCAAGGAGTAATAGAATCTAT GAATAAAGAATTAAAGAAAATTATAGGACAGGTAA

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GAGATCAGGCTAACATCTTAAGACAGCAGTACAA ATGGCAGTATTCACTCCACAATTTAAAAGAAAAGG GGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGAAAGAATAG TAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAAAGAA TTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAAATTCGG GTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTTGGAA AGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAGGTGAAGGGG CAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTA GTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGGATTA TGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAA GTAGACAGGATGAGGATTAA
23	plásmido auxiliar/Rev; RRE del HIV; se une al elemento Rev	AGGAGTTGTCCTGGTTCTGGGAGCAGCAGG AAGCACTATGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGG TACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTCAGC AGCAGAACAAATTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAA CAGCATCTGTCAACTCACAGTCTGGGCATCAAG CAGCTCCAGGCAAGAACCTGGCTGTGGAAAGATA CCTAAAGGATCAACAGCTCCT
24	plásmido auxiliar/Rev; Rev del HIV; exportación nuclear y estabilización del ARNm vírico	ATGGCAGGAAGAACGGAGACAGCGACGAAGAAC TCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTCTATC AAAGCAACCCACCTCCAATCCCAGGGGACCCGA CAGGCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAG AGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGG ATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTCGGGAGCCT GTGCCTCTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACT CTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTCTGGGACG CAGGGGGTGGAAAGCCCTCAAATATTGGTGGAAATC TCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG

(continuación)

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Descripción</b>	<b>Secuencia</b>
25	Envoltura; promotor de CMV; transcripción	ACATTGATTATTGACTAGTTATAATAGTAATCAAT TACGGGGTCATTAGTCATAGCCCCATATGGAGTT CCCGCGTTACATAACTACGGTAAATGGCCCGCTGG CTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAAT AATGACGTATGTTCCCAGTAGAACGCCAATAGGGAC  TTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTA AACTGCCCACTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAA ATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTT ATGGGACTTTCCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATT AGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTGGCA GTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTTGACTCACG GGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGG GAGTTGTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTCC AAAATGTCGTAACAACCTCCGCCATTGACGCAAAT GGCGGGTAGGCCTGTACGGTGGGAGGTCTATATAA GC

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
26	Envoltura; VSV-G; entrada de glucoproteína a las células de la envoltura	ATGAAGTGCCTTTGACTTAGCCTTTATTCAATT GGGTGAATTGCAAGTCACCATACTTTCCACACA ACCAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTCCTCTAATT ACCATTATTGCCGTCAAGCTCAGATTAAATTGGC ATAATGACTTAATAGGCACAGCCTACAAGTCAA ATGCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGCAGACGG TTGGATGTGTCATGCTCCAAATGGGTCACTACTTG TGATTTCGCTGGTATGGACCGAAGTATATAACACA TTCCATCCGATCCTCACTCCATCTGTAGAACAAATG CAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAGGAACCT GGCTGAATCCAGGCTCCCTCCTCAAAGTTGTGGAT ATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTGATTGTCC AGGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTTGATGAATACA CAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATCAACCGA AAATGCAGCAATTACATATGCCCACTGTCCATAAC TCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTCAAAGGG CTATGTGATTCTAACCTCATTCCATGGACATCACCT TCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCCCTGGAA AGGAGGGCACAGGGTTCAGAAGTAACTACTTGCTT ATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGAAAATGCAATAC TGCAAGCATTGGGAGTCAGACTCCCATCAGGTGTC

# ES 2 965 357 T3

(continuación)

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Descripción</b>	<b>Secuencia</b>
		TGGTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCTTGCTGCA GCCAGATTCCCTGAATGCCAGAAGGGTCAAGTATC TCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGTAAGTCTA ATTCAAGGACGTTGAGAGGATCTGGATTATTCCCTC TGCCAAGAACCTGGAGCAAATCAGAGCGGGTCT TCCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATCTGCTCCT AAAAACCCAGGAACCAGGCCTGCTTCACCATAATC AATGGTACCCCTAAAATACTTGAGACCAGATAACATC AGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCTCAAGAATG GTCGGAATGATCAGTGGAACTACCACAGAAAGGGA ACTGTGGATGACTGGCACCATATGAAGACGTGG AAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGACCAGTTCA GGATATAAGTTCCCTTATACATGATTGGACATGGT ATGTTGGACTCCGATCTTCATCTTAGCTCAAAGGCT CAGGTGTTCGAACATCCTCACATTCAAGACGCTGCT TCGCAACTCCTGATGATGAGAGTTATTTTGGTG ATACTGGCTATCCAAAATCCAATCGAGCTTGTAG AAGGTTGGTCAGTAGTTGGAAAAGCTCTATTGCCT CTTTTTCTTATCATAGGGTTAACATTGGACTATT CTTGGTTCTCCGAGTTGGTATCCATCTTGCATTAAA TTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTATACAGA CATAGAGATGA
27	plásmido auxiliar/Rev; potenciador temprano de CMV (CAG); mejora de la transcripción	TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT TCATAGCCCATAATGGAGTTCCGCGTTACATAACT TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACG ACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTG CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTC AATGGGTGGACTATTACGGTAAACTGCCACTTGG CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC CTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGG ATTATGCCAGTACATGACCTTATGGACTTTCTA CTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC

(continuación)

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Descripción</b>	<b>Secuencia</b>
28	plásmido auxiliar/Rev; intrón de beta actina de pollo; mejora de la expresión genética	GGAGTCGCTGC GTTGC CCTCG CCCC GTGCC CGCTC CGCGCCGCCTCGCGCCGCCGCCGCCGGCTCTGACTG ACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGG CCCTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAA TGACGGCTCGTTCTTCTGTGGCTGCGTGAAAGC CTTAAAGGGCTCCGGGAGGGGCCTTGTGCGGGGG GGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGC GTGTGTGTGC GTGGGGAGCGCCGCGTGC GGCCC GCGCTGCCCGC GGCTGTGAGCGCTGC GGCGCGCGCGGGCTTG TGC GCTCCCGTGTGCGCGAGGGAGCGCGGCCGG GGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGCTGCGAGGG GAACAAAGGCTGCGTGC GG GTGTGCGTGGGG GGT GAGCAGGGGTGTGGCGCGGGCTGGCTG TAACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGA GCACGGCCGGCTCGGGTGC GG GCTCCGTGCG GGCGTGGCGCGGGCTCGCCGTGCCGGCGGGGG TGGCGCAGGTGGGGTGC CGGGCGGGCGGGCG GCCTCGGGCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGCGCG GCGGCCCCGGAGCGCCGGCGCTGTCGAGGCGCG CGAGCCG CAGCCATTGCCTTTATGGTAATCGTGCG AGAGGGCGCAGGGACTCCTTGTCCAAATCTGGC GGAGCCGAAATCTGGGAGGGCGCCGCGCACCCCT CTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGCGCCGGCA GGAAGGAAATGGCGGGGAGGGCCTCGTGC GTCG CCGCGCCGCCGTCCCTCTCCATCTCCAGCCTCGG GGCTGCCGCAGGGGGACGGCTGCCTCGGGGGGA CGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGAC CGGC GG

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
29	plásmido auxiliar/Rev; poli A de beta globina de conejo; estabilidad del ARN	AGATCTTTCCCTGCCAAAAATTATGGGGACAT CATGAAGCCCCTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATA AAGGAAATTATTCATTGCAATAGTGTGGAA TTTTTGTGCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAG GGCAAATCATTAAAACATCAGAATGAGTATTGGT TTAGAGTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCC  ATGAACAAAGGTGGCTATAAGAGGTACAGTAT ATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCCCTATTCCAT AGAAAAGCCTGACTTGAGGTTAGATTTTTATA TTTGTTTGTGTTTTCTTAACATCCCTAAA ATTTCCCTACATGTTACTAGCCAGATTTCCTC CTCTCCTGACTACTCCCAGTCATAGCTGTCCCTCTC TCTTATGAAGATC
30	Envoltura; intrón de beta globina; mejora de la expresión genética	GTGAGTTGGGACCTTGATTGTTCTTCTTTG CTATTGAAAATTCTGTTATATGGAGGGGGCAAAG TTTCAGGGTGTGTTAGAATGGGAAGATGTCCCT TGTATCACCATGGACCCTCATGATAATTGTTCTT TCACCTTCTACTCTGTTGACAACCATTGTCTCCTCTT ATTTCCTTCATTTCTGTAACCTTCTGTTAAACTT TAGCTTGCAATTGTAACGAATTAAATTCACTTT GTTTATTGTCAGATTGTAAGTACTTCTCTAATCAC TTTTTTCAAGGCAATCAGGGTATATTATATTGTAC TTCAGCACAGTTAGAGAACATTGTTATAATTAA ATGATAAGGTAGAATATTCTGCATATAATTCTGG CTGGCGTGGAAATATTCTTATTGGTAGAAACAACACTA CACCCCTGGTCATCATCCTGCCTTCTCTTATGGTTA CAATGATATACACTGTTGAGATGAGGATAAAATAC TCTGAGTCCAACCCGGGCCCCCTGCTAACCATGTT CATGCCTTCTCTCTTCTACAG

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
31	Envoltura; poli A de beta globina de conejo; estabilidad del ARN	AGATCTTTCCCTGCCCCAAATTATGGGGACAT CATGAAGCCCCTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATA AAGGAAATTATTTCAATTGCAATAGTGTGTTGGAA TTTTTGTCCTCACTCGGAAGGACATATGGGAG GGCAAATCATTAAAACATCAGAATGAGTATTGGT TTAGAGTTGGCAACATATGCCATATGCTGGCTGC CATGAACAAAGGTTGGCTATAAAGAGGTATCAGT ATATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCC ATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTA TATTTGTTTGTGTTATTTTTCTTAACATCCCTA  AAATTTCTTACATGTTTACTAGCCAGATTTTCC TCCTCTCCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCTCT TCTCTTATGGAGATC
32	Cebador	TAAGCAGAATTGATGAATTGCCAGGAAGAT
33	Cebador	CCATACAATGAATGGACACTAGGCAGGCCGACGAA T

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
34	Gag, Pol, fragmento de integrasa	GAATTCATGAATTGCCAGGAAGATGGAAACCAAA AATGATAGGGGAAATTGGAGGTTTATCAAAGTAA GACAGTATGATCAGATACTCATAGAAATCTGCGGA CATAAAGCTATAGGTACAGTATTAGTAGGACCTACA CCTGTCAACATAATTGGAAGAAATCTGTTGACTCAG ATTGGCTGCACITTAATTTCCCATTAGTCCTATTG AGACTGTACCAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGAT GGCCCAAAAGTTAACAAATGCCATTGACAGAAGA AAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTGTACAGAAA TGGAAAAGGAAGGAAAAATTCAAAAATTGGGCCT GAAAATCCATACAATACTCCAGTATTGCCATAAAG AAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGA TTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGATTCTG GGAAGTTCAATTAGGAATACCACATCCTGCAGGGTT AAAACAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGG GCGATGCATATTTTCAGTCCCTTAGATAAAGACT TCAGGAAGTATACTGCATTACCATACCTAGTATAA ACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAAT GTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAAT ATTCCAGTGTAGCATGACAAAAATCTAGAGCCTT TAGAAAACAAAATCCAGACATAGTCATCTATCAAT ACATGGATGATTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAA TAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAACGTGAGA CAACATCTGTTGAGGTGGGGATTACACACCAGAC AAAAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCCCTTGATG GGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAG CCTATAGTGCTGCCAGAAAAGGGACAGCTGGACTGT

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CAATGACATAACAGAAATTAGTGGGAAAATTGAATT GGCAGTCAGATTATGCAGGGATTAAAGTAAGG CAATTATGTAAACTCTTAGGGAACCAAAGCACTA ACAGAAGTAGTACCACTAACAGAAGAACGAGCT AGAACTGGCAGAAAACAGGGAGATTCTAAAGAAC CGGTACATGGAGTGTATTATGACCCATCAAAGACT TAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGCAAGGCCAA TGGACATATCAAATTATCAAGAGCCATTAAAAAT CTGAAAACAGGAAAGTATGCAAGAATGAAGGGTGC CCACACTAATGATGTGAAACAATTAACAGAGGCAG TACAAAAAAATAGCCACAGAAAGCATAGTAATATGG GGAAAGACTCCTAAATTAAATTACCCATACAAAAA GGAAACATGGGAAGCATGGTGACAGAGTATTGGC AAGCCACCTGGATTCTGAGTGGAGTTGTCAATA CCCCCTCCTTAGTGAAGTTATGGTACCAAGTTAGAGA AAGAACCCATAATAGGAGCAGAAACTTCTATGTA GATGGGGCAGCCAATAGGAAACTAAATTAGGAAA AGCAGGATATGTAACTGACAGAGGAAGACAAAAAG TTGICCCCCCTAACGGACACAACAAATCAGAAGACT GAGTTACAAGCAATTCTAGCTTGCGAGGATTGCG GGATTAGAAGTAAACATAGTGAACAGACTCACAATA TGCATTGGGAATCATTCAAGCACAACCAAGATAAGA GTGAATCAGAGTTAGTCAGTCAGTAAATAATAGAGCAG TTAATAAAAAAGGAAAAAGTCTACCTGGCATGGGT ACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAATGAACAAAG TAGATAAATTGGTCAGTGCTGGAAATCAGGAAAGTA CTATTTTAGATGGAATAGATAAGGCCAAGAAGA ACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGAGCAATGG CTAGTGATTITAACCTACCAACCTGTAGTAGCAAAG AAATAGTAGCCAGCTGTGATAATGTCAGCTAAAAG GGGAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTAGCCC AGGAATATGGCAGCTAGATTGTACACATTAGAAC GAAAAGTTATCTTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTG

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GATATATAGAAGCAGAAGTAATTCCAGCAGAGACA GGCAAGAACAGCATACTTCCTCTTAAATTAGCA GGAAGATGCCAGTAAAACAGTACATACAGACAA TGGCAGCAATTCAACCAGTACTACAGTTAAGGCCGC CTGTTGGTGGCGGGGATCAAGCAGGAATTGGCA TTCCCTACAATCCCCAAAGTCAGGAGTAATAGAAT CTATGAATAAAGAATTAAAGAAAATTATAGGACAG GTAAGAGATCAGGCTAACATCTTAAGACAGCAGT ACAAATGGCAGTATTCCACAAATTAAAAGAAA AGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGAAAGA ATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAAACTAA AGAATTACAAAAACAAATTACAAAATTCAAATT TTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAGATCCAGTT GGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGAAAGGTGAA GGGGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAA AGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATCAGGG ATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTG GCAAGTAGACAGGATGAGGATTAA
35	fragmento de ADN que contiene Rev, RRE y poli A de beta globina de conejo	TCTAGAATGGCAGGAAGAACGGAGACAGCGACGA AGAGCTCATCAGAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCT CTATCAAAGCAACCCACCTCCAATCCGAGGGGA CCCGACAGGCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGG AGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGA ACGGATCCTGGCACTTATCTGGACGATCTGCGGA GCCTGTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACT TACTCTGATTGTAACGAGGATTGTGAACTCTGG GACGCAGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGG AATCTCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAAT AGAGGAGCTTGTCCCTGGGTCTGGGAGCAGCA GGAAGCACTATGGCGCAGCGTCAATGACGCTGAC GGTACAGGCCAGACAATTATTGCTGGTATAGTGA GCAGCAGAACAAATTGCTGAGGGCTATTGAGGC AACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGCATCA

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		AGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGA TACCTAAAGGATCAACAGCTCCTAGATTTTCCC TCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCTT GAGCATCTGACTCTGGCTAATAAAGGAAATTATT TTCATTGCAATAGTGTGTTGAAATTTTGTGTCTCT CACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATT AACACATCAGAATGAGTATTGGTTAGAGTTGGCA ACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTG GCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCC CTGCTGTCCATTCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGA CTTGAGGTTAGATTTTTATATTTGTTGTGTT ATTTTTCTTAACATCCCTAAAATTTCTTACAT GTTTACTAGCCAGATTTCCCTCCTCTGACTAC TCCCAGTCATAGCTGCCCTCTCTTATGAAGATC CCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGGCGTAATCATGGT CATAGCTTTCCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAC AATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGT GTAAAGCCTGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTC ACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTCCAG TCGGGAAACCTGCGTGCCTCGAGCGGATCCGATCTCA ATTAGTCAGCAACCATACTCCGCCAGTCCGCCATT CCATCCGCCCTAACTCCGCCAGTCCGCCATT CTCCGCCCTAGGCTGACTAATTTTTATTTATGC AGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCA GAAGTAGTGAGGAGGCTTTTGGAGGCCTAGGCTT TTGCAAAAGCTAATTGTTATTGCAGCTTATAAT GGTTACAAATAAGCAATAGCATCACAAATTCAC AAATAAAGCATTTCACTGCATTCTAGTTGTGGT TTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCAGCGGCCG CCCCGGG
36	fragmento de ADN que contiene CAG secuencia de potenciador/promotor/intrón	ACGCGTTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTCCGCGTTAC ATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC

## ES 2 965 357 T3

(continuación)

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Descripción</b>	<b>Secuencia</b>
		CAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTA TGTCCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTG ACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAACTGCCA CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC GCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCC CTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTT TCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGC TATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCT TCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAAT TTTGTATTTATTTATTTTAATTATTTGTGCAGCG ATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGC GGGGCGGGCGGGCGAGGGCGGGCGGGCGGA GGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGC GCGCTCCGAAAGTTCTTTATGGCGAGGCAGCG CGCGCGCGCCCTATAAAAGCGAAGCGCGCG GGCAGGAGTCGCTGCCTGCCTCGCCCCGTGCC GCTCCGCGCCGCTCGGCCGCCGCCGGCTCTG ACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGG ACGGCCCTTCCTCCCTCCGGCTGTAATTAGCGCTTGG TTTAATGACGGCTCGTTCTTTCTGTGGCTGCGTGA AAGCCTAAAGGGCTCCGGAGGGCCCTTGTGCG GGGGGGAGCGGGCTGGGGGTGCGTGCGTGTGT GTGCGTGGGAGCGCCGCGTGCAGGGCGCGCTGCC CGCGGCTGTGAGCGCTGCAGGGCGCGCGGG TTTGTGCGCTCCCGTGTGCGCAGGGAGCGCG CGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGCTGCGA GGGAAACAAAGGCTGCGTGCAGGGGTGCGTGG GGGGGTGAGCAGGGGTGAGGGCGCGGGCG CTGTAACCCCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGC TGAGCACGGCCCGGCTCGGGTGCAGGGCTCCGTGC GGGCGTGGCGCGGGCTGCCGTGCCGGCGGG GGTGGCGCAGGTGGGGTGCAGGGCGGGCGGG CCGCCTCGGGCGGGAGGGCTCGGGGAGGGCG

## ES 2 965 357 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGCTGTCGAGGC GGCAGCCGCAGCCATTGCCTTTATGGTAATCGT CGAGAGGGCGCAGGGACTCCTTGTCCTAAATCTG GCGGAGCCGAAATCTGGAGGCGCCGCCACCCC CTCTAGCGGGCGCGGGCGAACGGTGCGGCGCCGG CAGGAAGGAAATGGCGGGGAGGGCCTCGTGC CGCCGCGCCCGTCCCCTCTCCATCTCCAGCCTC GGGGCTGCCGCAGGGGACGGCTGCCTCGGGGG GACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTG ACCGGCGGGAATT
37	fragmento de ADN que contiene VSV-G	GAATTCATGAAGTGCCTTGACTTAGCCTTTAT TCATTGGGTGAATTGCAAGTCACCATAAGTTTC CACACAACCAAAAAGGAAACTGGAAAAATGTTCT TCTAATTACCAATTGCCCCGTCAAGCTCAGATT AATTGGCATAATGACTTAATAGGCACAGCCTACAA GTCAAATGCCAAGAGTCACAAGGCTATTCAAGC AGACGGTTGGATGTGTCATGCTCAAATGGTCAC TACTTGTGATTCCCGCTGGTATGGACCGAAGTATAT AACACATTCCATCCGATCCTCACTCCATCTGTAGA ACAATGCAAGGAAAGCATTGAACAAACGAAACAAG GAACTTGGCTGAATCCAGGCTCCCTCCTCAAAGTT GTGGATATGCAACTGTGACGGATGCCGAAGCAGTG ATTGTCCAGGTGACTCCTCACCATGTGCTGGTGAT GAATACACAGGAGAATGGGTTGATTCACAGTTCATC AACGGAAAATGCAGCAATTACATATGCCCACTGTC CATAACTCTACAACCTGGCATTCTGACTATAAGGTC AAAGGGCTATGTGATTCTAACCTCATTCCATGGAC ATCACCTTCTCAGAGGACGGAGAGCTATCATCC CTGGAAAGGAGGGCACAGGGTTCAGAAGTAAC CTTGCTTATGAAACTGGAGGCAAGGCCTGCAAAT GCAATACTGCAAGCATTGGGGAGTCAGACTCCCAC AGGTGTCTGGTTCGAGATGGCTGATAAGGATCTCT TGCTGCAGCCAGATTCCCTGAATGCCAGAAGGGTC

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		AAGTATCTCTGCTCCATCTCAGACCTCAGTGGATGT AAGTCTAACATTCAAGGACGTTGAGAGGATCTGGATTA TTCCCTCTGCCAAGAAACCTGGAGCAAAATCAGAG CGGGTCTTCCAATCTCTCCAGTGGATCTCAGCTATC TTGCTCCTAAAAACCCAGGAACCGGTCTGCTTCA CCATAATCAATGGTACCCCTAAAATCTTGAGACCA GATACATCAGAGTCGATATTGCTGCTCCAATCCTCT CAAGAATGGTCGGAATGATCAGTGGAACTACCACA GAAAGGAAACTGTGGGATGACTGGGCACCATATGA AGACGTGGAAATTGGACCCAATGGAGTTCTGAGGA CCAGTTCAAGGATATAAGTTCTTTATACATGATTG GACATGGTATGTTGGACTCCGATCTCATCTTAGCT CAAAGGCTCAGGTGTTCGAACATCCTCACATTCAAG ACGCTGCTTCGCAACTCCTGATGATGAGAGTTAT TTTTGGTGTAACTGGCTATCCAAAATCCAATCG AGCTTGTAGAAGGTTGGTCAGTAGTTGGAAAAGCT CTATTGCCTCTTTCTTATCATAGGGTTAACAT TGGACTATTCTGGTTCTCCGAGTTGGATCCATCTT TGCATTAAATTAAAGCACACCAAGAAAAGACAGAT TTATACAGACATAGAGATGAGAATT
38	Rev; promotor de RSV; transcripción	ATGGCAGGAAGAACGGAGACAGCGACGAAGAAC TCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTCTCTATC AAAGCAACCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCGA CAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAG AGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAACGG ATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTCGGGAGCCT GTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACT CTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACATTCTGGGACG CAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAAATC TCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG

(continuación)

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Descripción</b>	<b>Secuencia</b>
39	Rev; Rev del HIV; exportación nuclear y estabilización de  ARNm vírico	ATGGCAGGAAGAACGGAGACAGCGACGAAGAAC TCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTCTCTATC AAAGCAACCCACCTCCCAATCCGAGGGGACCGA  CAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAACGGTGGAGAG AGAGACAGAGACAGATCCATTGATTAGTGAAACGG ATCCTTAGCACTTATCTGGGACGATCTGCGGAGCCT GTGCCTCTCAGCTACCACCGCTTGAGAGACTTACT CTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACCTCTGGGACG CAGGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAAATC TCCTACAATATTGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAG

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
40	promotor del RSV y Rev del HIV	CAATTGCGATGTACGGGCCAGATATA CGGTATCTG AGGGGACTAGGGTGTGTTAGGC AAAAGCGGGGC TTCGGTTGTACCGGTTAGGAGTCCCCTCAGGATAT AGTAGTTCGCTTTGCATAGGGAGGGGGAAATGTA GTCTTATGCAATAACACTTGTAGTCTGCAACATGGT AACGATGAGTTAGCAACATGCCTACAAGGAGAGA AAAAGCACCGTGATGCCGATTGGT GGAAGTAAGG TGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGAC AGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTCCG CATTGCAGAGATAATTGTATTAAGTGCCTAGCTCG ATACAATAAACGCCATTGACCATT CACCACATTGG TGTGCACCTCCAAGCTCGAGCTCGTTAGTGAACCG TCAGATGCCCTGGAGACGCCATCCACCGCTGTTGA CCTCCATAGAACACCGGGACCGATCCAGCCTCCC CTCGAAGCTAGCGATTAGGCATCTCCTATGGCAGGA AGAACGGAGACAGCGACGAAGAACTCCTCAAGGC AGTCAGACTCATCAAGTTCTCTATCAAAGCAACCC ACCTCCAATCCCAGGGGACCCGACAGGCCGAA GGAATAGAAGAAGAACGGTGGAGAGAGAGACAGAG ACAGATCCATTGATTAGTGAACGGATCCTAGCAC TTATCTGGACGATCTCGGAGCCTGTGCCTCTCA GCTACCACCGCTTGAGAGACTTACTCTGATTGTA CGAGGATTGTGGAACTTCTGGGACGCAGGGGTGG GAAGCCCTCAAATATTGGT GGAATCTCCTACAATAT TGGAGTCAGGAGCTAAAGAATAGTCTAGA
41	Elongación Promotor del factor 1 alfa (EF 1-alfa)	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGGGGTAAACTGG

## ES 2 965 357 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GAAAGTGTGTCGTACTGGCTCCGCCTTTCCC GAGGGTGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGT CGCCGTGAACGTTTTCGCAACGGGTTGCCGC CAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGGTCCCGCG GGCCTGGCCTCTTACGGTTATGGCCCTGCGTGC CTTGAATTACTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTG ATTCTTGATCCCGAGCTCGGGTTGGAAGTGGTGG GAGAGTTCGAGGCCTTGCCTAAGGAGCCCCCTCG CCTCGTGTGAGTTGAGGCCTGGCCTGGCGCTGG GGCCGCCCGTGCATCTGGTGGCACCTCGCGCC TGTCTCGCTGCTTCGATAAGTCTCTAGCCATTAAA ATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCTGCACAC TGGTATTCGGTTTGGGGCGCGGGCGACGG GGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTCGGCGAGGC GGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCTGCTCTGGTGCCT GGCCTCGCCGCCGTGTATGCCCGCCCTGGCG GCAAGGCTGGCCCAGTCGGCACCAAGTGCAGC GGAAAGATGGCCGCTTCCCGCCCTGCTGCAGGGA GCTAAAATGGAGGACGCGCGCTGGAGAGCGG GCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCT TCCGTCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGA GTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTC GAGCTTTGGAGTACGTCGTCTTAGGTTGGGGGA GGGGTTTATGCGATGGAGTTCCCCACACTGAGTG GGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTGGCACTTGAT GTAATTCTCCTTGGATTGCCCTTTGAGTTGG TCTTGGTTCATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTCAA AGTTTTTCTTCCATTTCAGGTGTCGTGA
42	Promotor; PGK	GGGGTTGGGGTTGCGCCTTCCAAGGCAGCCCTGG GTTGCGCAGGGACGCCGGCTGCTCTGGCGTGGTTC CGGGAAACGCAGCGGCCGACCCTGGGTCTCGCA

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CATTCTCACGTCCGTTCGCAGCGTCACCCGGATCT TCGCCGCTACCCCTGTGGGCCCCCGCGACGCTTC CTGCTCCGCCCCTAAGTCGGGAAGGTTCCCTGCGGT TCGC GGCGTGCCGGACGTGACAAACGGAAGCCGCA CGTCTCACTAGTACCCTCGCAGACGGACAGCGCCAG GGAGCAATGGCAGCGCGCCGACCGCGATGGCTGT GGCCAATAGCGGCTGCTCAGCAGGGCGCGCCGAGA GCAGCGGCCGGAAAGGGCGGTGCGGGAGGCGGG GTGTGGGGCGGTAGTGTGGGCCCTGTCCTGCCGC GCGGTGTTCCGCATTCTGCAAGCCTCCGGAGCGCAC GTCGGCAGTCGGCTCCCTCGTTGACCGAATACCGA CCTCTCTCCCCAG
43	Promotor; UbC	GCGCCGGGTTTGGCGCCTCCGCGGGCGCCCCCT CCTCACGGCGAGCGCTGCCACGT CAGACGAAGGGC GCAGGAGCGTTCTGATCCTCCGCCGGACGCTCA GGACAGCGGCCGCTGCTCAT AAGACTCGGCCTAG AACCCCAGTATCAGCAGAAGGACATT TAGGACGG GACTTGGGTGACTCTAGGGCACTGGTTTCTTCCA GAGAGCGGAACAGGGCAGGAAAAGTAGTCCCTCT CGCGATTCTGCGGAGGGATCTCGTGGGGCGGTG AACGCCGATGATTATATAAGGACGCCGGGTG GCACAGCTAGTCCGTCGCAGCCGGATTGGGTG CGGTTCTTGTGGATCGCTGTGATCGTCACTGG TGAGTTGCGGGCTGCTGGCTGGCCGGGCTTCGT GGCCGCCGGCCGCTCGTGGACGGAAAGCGTGTG GAGAGACGCCAAGGGCTGTAGTCTGGTCCCGA GCAAGGTTGCCCTGA ACTGGGGTTGGGGAGCG CACAAAATGGCGGCTGTTCCGAGTCTGAATGGAA GACGCTTGTAAAGGCGGCTGTGAGGTCGTTGAAAC AAGGTGGGGGGCATGGTGGCGGCAAGAACCAAG GTCTTGAGGCCTCGCTAATGCGGGAAAGCTCTTAT TCGGGTGAGATGGCTGGGCACCATCTGGGACC CTGACGTGAAGTTGTCACTGACTGGAGAACTCGGG

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		TTTGTCTGGTGCAGGCGGCAGTTATGCGGT GCCGTTGGCAGTGACCCGTACCTTGGAGCGCG CGCCTCGTGTGACGTACCCGTTCTGTGG CTTATAATGCAGGGTGGGCCACCTGCCGGTAGGTG TGCAGTAGGCTTCCTCCGTCGAGGACGCAGGGTT CGGGCCTAGGGTAGGCTCTGAATCGACAGGCG CCGGACCTCTGGTGAGGGAGGGATAAGTGAGGCG TCAGTTCTTGGTCGGTTATGTACCTATCTTCTT AAGTAGCTGAAGCTCCGGTTTGAACTATGCGCTCG GGGTTGGCGAGTGTGTTTGTGAAGTTTTAGGCA CCTTTGAAATGTAATCATTTGGTCAATATGTAAT TTTCAGTGTAGACTAGTAAA
44	poli A; SV40	GTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAGCAA TAGCATCACAAATTCAAAATAAACGATTTC ACTGCATTCTAGTTGGTTGTCCAAACTCATCAA TGTATCTATCA
45	poli A; bGH	GACTGTGCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGC CCCTCCCCGTGCCTCCTGACCCTGGAAGGTGCC ACTCCCCTGCTTCTTAATAAAATGAGGAAATT GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTG GGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGG ATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCG GTGGGCTCTATGG

(continuación)

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Descripción</b>	<b>Secuencia</b>
46	Envoltura; RD114	ATGAAACTCCAACAGGAATGGTCATTTATGTAGC CTAATAATAGTCGGGCAGGGTTGACGACCCCCGC AAGGCTATCGCATTAGTACAAAAACACATGGTAA ACCATGCGAATGCAGCGGAGGGCAGGTATCCGAGG CCCCACCGAACTCCATCCAACAGGTAAC TGCCCAG GCAAGACGGCCTACTTAATGACCAACCAAAAAATGG AAATGCAGAGTCACTCCAAAAAATCTCACCCCTAGC GGGGGAGAACTCCAGAACTGCCCTGTAACACTTTC CAGGACTCGATGCACAGTTCTGTTACTGAATAC CGGCAATGCAGGGCGAATAATAAGACATACTACAC

(continuación)

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Descripción</b>	<b>Secuencia</b>
		GGCCACCTTGCTAAAATACGGTCTGGGAGCCTCAA CGAGGTACAGATATTACAAAACCCAATCAGCTCCT ACAGTCCCCTGTAGGGCTCTATAAATCAGCCGT TTGCTGGAGTGCCACAGCCCCATCCATATCTCCGA TGGTGGAGGACCCCTCGATACTAAGAGAGTGTGGA CAGTCCAAAAAAGGCTAGAACAAATTATAAGGCT ATGCATCCTGAACTCAATACCACCCCTAGCCCTG CCCAAAGTCAGAGATGACCTTAGCCTGATGCACGG ACTTTGATATCCTGAATACCACCTTAGGTTACTCC AGATGTCCAATTTAGCCTGCCAAGATTGTTGGC TCTGTTAAAACACTAGGTACCCCTACCCCTTGC TACCCACTCCCCCTTAACCTACTCCCTAGCAGACTC CCTAGCGAATGCCTCTGTCACTTACCTCC CTTGGTTCAACCGATGCAGTTCTCCAACTCGCTCTG TTTATCTTCCCTTCATTAACGATAACGGAAACAA AGACTTAGGTGCACTCACCTTACTAACTGCACCTC TGTAGCCAATGTCAGTAGTCCTTATGTGCCCTAAA CGGGTCAGTCTCCTCTGTGGAAATAACATGGCATA CACCTATTAACCCAAAATGGACAGGACTTGCGT CCAAGCCTCCCTCCCTGGACATTGACATCATCCC GGGGGATGAGCCAGTCCCCATTCTGCCATTGATCA TTATATACATAGACCTAACGAGCTGTACAGTTCAT CCCTTACTAGCTGGACTGGAAATCACCGCAGCATT CACCAACGGAGCTACAGGCCTAGGTGTCCGTAC CCAGTATACAAAATTATCCCATCAGTTAATATCTGA TGTCCAAGTCTTATCCGTACCATACAAGATTACA AGACCAAGGTAGACTCGTTAGCTGAAGTAGTTCTCCA AAATAGGAGGGGACTGGACCTACTAACGGCAGAAC AAGGAGGAATTGTTAGCCTACAAAGAAAAATGCT GTTTTATGCTAACAGTCAGGAATTGTGAGAAACA AAATAAGAACCCCTACAAGAAGAATTACAAAAACGC AGGGAAAGCCTGGCATCCAACCCCTCTGGACCGG GCTGCAGGGCTTCTCCGTACCTCCTACCTCTCCTG

## ES 2 965 357 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GGACCCCTACTCACCTCCTACTCATACTAACATT GGGCATGCGTTCAATCGATTGGTCCAATTGTT AAAGACAGGATCTCAGTGGTCCAGGCTCTGGTTTG ACTCAGCAATATCACCAGCTAAAACCCATAGAGTA CGAGCCATGA
47	Envoltura; GALV	ATGCTTCTCACCTCAAGCCCGACCACCTCGGCAC CAGATGAGTCCTGGAGCTGGAAAAGACTGATCAT CCTCTTAAGCTGCGTATTGGAGACGGCAAAACGA GTCTGCAGAATAAGAACCCCCACCAGCCTGTGACCC TCACCTGGCAGGTACTGTCCCAAACGGGGACGTTG TCTGGGACAAAAAGGCAGTCCAGCCCCTTGGACTT GGTGGCCCTCTCTTACACCTGATGTATGTGCCCTGG CGGCCGGTCTTGAGTCCTGGGATATCCCAGGATCCG ATGTATCGTCCTCTAAAAGAGTTAGACCTCCTGATT CAGACTATACTGCCGCTTATAAGCAAATCACCTGGG GAGCCATAGGGTGCAGCTACCCCTGGGCTAGGACC AGGATGGCAAATTCCCCCTTACGTGTGTCCCCGA GCTGGCGAACCCATTAGAAGCTAGGAGGTGTGG GGGGCTAGAATCCCTATACTGTAAAGAATGGAGTT GTGAGACCACGGGTACCGTTATTGGCAACCCAAGT CCTCATGGGACCTCATAACTGTAAAATGGACCAA AATGTGAAATGGGAGCAAAATTCAAAGTGTGA ACAAACCGGCTGGTGAACCCCCCTCAAGATAGACTT CACAGAAAAAGGAAAACCTCCAGAGATTGGATAA CGGAAAAAACCTGGGAATTAAGGTTATGTATATG GACACCCAGGCATACAGTTGACTATCCGCTTAGAGG TCACTAACATGCCGGTTGTGGCAGTGGGCCAGACC CTGTCCTTGGAACAGGGACCTCCTAGCAAGCCCC TCACTCTCCCTCTCTCCCCACGGAAAGCGCCGCCA CCCCCTTACCCCCGGCGGCTAGTGAGCAAACCCCTG CGGTGCATGGAGAAACTGTTACCTAAACTCTCCGC CTCCCCACCAGTGGCGACCGACTCTTGGCCTGTGC AGGGGGCCTCCTAACCTGAATGCTACCAACCCAG

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GGGCCACTAAGTCTGCTGGCTCTGTTGGCATGA GCCCCCCTTATTATGAAGGGATAGCCTCTCAGGAG AGTCGCTTATACCTCCAACCATAACCGATGCCACT GGGGGGCCCAAGGAAAGCTTACCCCTCACTGAGGTC TCCGGACTCGGGTCATGCATAGGAAGGTGCCTCTT ACCCATCAACATCTTGCAACCAGACCTACCCATC AATTCCCTCTAAAAACCATCAGTATCTGCTCCCTCA AACCATAGCTGGTGGCCTGCAGCACTGGCCTCACC CCCTGCCTCTCCACCTCAGTTTAATCAGTCTAAAG ACTTCTGTGTCCAGGTCCAGCTGATCCCCGCATCT ATTACCATTCTGAAGAAACCTTGTACAAGCCTATG ACAAATCACCCCCCAGGTTAAAAGAGAGCCTGCCT CACTTACCCTAGCTGTCTCCTGGGTTAGGGATTG CGGCAGGTATAGGTACTGGCTAACCGCCCTAATTA AAGGGCCCATAAGACCTCCAGCAAGGCCTAACCAGC CTCCAAATGCCATTGACGCTGACCTCCGGGCCCTT CAGGACTCAATCAGCAAGCTAGAGGACTCACTGAC TTCCCTATCTGAGGTAGTACTCCAAAATAGGAGAGG CCTGACTTACTATTCTTAAAGAAGGGAGGCCTCTG CGCGGCCCTAAAAGAAGAGTGCTGTTTATGTAGA CCACTCAGGTGCAGTACGAGACTCCATGAAAAAAC TTAAAGAAAGACTAGATAAAAGACAGTTAGAGCGC CAGAAAAACCAAACGGTATGAAGGGTGGTCAA TAACTCCCCTGGTTACTACCCACTATCAACCATC GCTGGGCCCTATTGCTCCTCCTTTGTTACTCACTC TTGGGCCCTGCATCATCAATAAAATTAAATCCAATTCA TCAATGATAGGATAAGTGCAGTCAAAATTAGTCC TTAGACAGAAATATCAGACCCCTAGATAACGAGGAA AACCTTAA
48	Envoltura; FUG	ATGGTTCCGCAGGTTCTTGTGTTGACTCCTCTGG GTTTTCTGTTGTTCGGAAAGTCCCCATTACAC GATACCAGACGAACCTGGTCCCTGGAGGCCCTATTGA CATACACCATCTCAGCTGTCAAATAACCTGGTTGT

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GGAGGATGAAGGATGTACCAACCTGTCCGAGTTCTC CTACATGGAACTCAAAGTGGGATACATCTCAGCCAT CAAAGTGAACGGGTTCACTTGCACAGGTGTTGTGAC AGAGGCAGAGACCTACACCAACITIGITGGITATGT CACAAACCACATTCAAGAGAAAGCATTCCGCCCCAC CCCAGACGCATGTAGAGCCGCGTATAACTGGAAGA TGGCCGGTGACCCCAGATATGAAGAGTCCTACAC AATCCATACCCGACTACCACTGGCTTCGAACTGTA AGAACCAACAAAGAGTCCTCATTATCATATCCCCA AGTGTGACAGATTGGACCCATATGACAAATCCCTT CACTCAAGGGTCTTCCCTGGCGGAAGTGCTCAGGA ATAACGGTGICCTCTACCTACTGCTCAACTAACCAT GATTACACCATTGGATGCCGAGAACATCCGAGACCA AGGACACCTGTGACATTTACCAATAGCAGAGGG AAGAGAGCATCCAACGGGAACAAGACTGCGGCTT TGTGGATGAAAGAGGCCTGTATAAGTCTCTAAAAG GAGCATGCAGGCTCAAGTTATGGAGTTCTGGAC TTAGACTTATGGATGGAACATGGTCGCGATGCAA ACATCAGATGAGACCAAATGGTGCCTCCAGATCA GTTGGTGAATTGACCGACTTCGCTCAGACGAGAT CGAGCATCTCGTTGGAGGAGTTAGTTAAGAAAA GAGAGGAATGTCTGGATGCATTAGAGTCATCATG ACCACCAAGTCAGTAAGTTCAGACGTCTCAGTCAC CTGAGAAAACCTGTCCAGGGTTGGAAAAGCATAT ACCATATTCAACAAAACCTGTGATGGAGGCTGATGCT CACTACAAGTCAGTCCGGACCTGGAATGAGATCATC CCCTCAAAAGGGTGGTGAAGTTGGAGGAAGGTG CCATCCTCATGTGAACGGGTGTTTCAATGGTAT AATATTAGGGCCTGACGACCATGTCCTAATCCCAGA GATGCAATCATCCCTCCAGCAACATATGGAGTT GTTGGAATCTCAGTTATCCCCCTGATGCACCCCT GGCAGACCCCTCTACAGTTCAAAGAAGGTGATGA GGCTGAGGATTTGTTGAAGTTCACCTCCCCGATGT

## ES 2 965 357 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GTACAAACAGATCTCAGGGGTTGACCTGGGTCTCCC GAACTGGGAAAGTATGTATTGATGACTGCAGGGG CCATGATTGGCCTGGTGTGATA TTTCCCTAATGA CATGGTGCAGAGTTGGTATCCATCTTGCATTAAAT TAAAGCACACCAAGAAAAGACAGATTATACAGAC ATAGAGATGAACCGACTTGGAAAGTAA
49	Envoltura; LCMV	ATGGGTCA GATTGTGACAATGTTGAGGCTCTGCCT CACATCATCGATGAGGTGATCAACATTGTCATTATT GTGCTTATCGT GATCACGGGTATCAAGGCTGTCTAC AATTTGCCACCTGTGGATATTGCATTGATCAGT TTCCTACTTCTGGCTGGCAGGCCTGTGGCATGTAC GGTCTTAAGGGACCCGACATTACAAAGGAGTTAC CAATTAAAGTCAGTGGAGTTGATATGTCACATCTG AACCTGACC ATGCCAACGCA TGT CAGCCAAC AAC TCCCACCATTACATCAGTATGGGACTTCTGGACTA GAATTGACCTTCACCAATGATTCCATCATCAGTCAC AACTTTGCAATCTGACCTCTGCCTTCAACAAAAG ACCTTGACCACACACTCATGAGTATA GTT CGAGC CTACACCTCAGTATCAGAGGGA ACTCCA ACTATAAG GCAGTATCCTGCGACTTCAACAATGGCATAACCATC CAATACAAC TTGACATTCTCAGATCGACAAAGTGCT CAGAGCCAGTGTAGAACCTTCAGAGGTAGAGTCCT AGATATGTTAGAACTGCCTCGGGGGAAATACAT GAGGAGTGGCTGGGCTGGACAGGCTCAGATGGCA AGACCACCTGGTGTAGCCAGACGAGTTACCAATAC CTGATTATAAAAATAGAACCTGGAAAACCACTG CACATATGCAGGTCTTTGGGATGTCAGGATTCT CCTTCCCAAGAGAAGACTAAGTTCTCACTAGGAG ACTAGCGGGCACATT CACCTGGACTTGT CAGACTC TTCAGGGGTGGAGAATCCAGGTGGTTATTGCCTGAC CAAATGGATGATTCTGCTGCAGAGCTTAAGTGT CGGGAACACAGCAGTTGC GAAATGCAATGTAAATC ATGATGCCAATTCTGTGACATGCTGCGACTAATTG

## ES 2 965 357 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		ACTACAACAAGGCTGCTTGAGTAAGTTCAAAGAG GACGTAGAATCTGCCTGCACTTATTCAAAACAACA GTGAATTCTTGATTTCAGATCAACTACTGATGAGG AACCACTTGAGAGATCTGATGGGGTGCCATATTGC AATTACTCAAAGTTGGTACCTAGAACATGCAAAG ACCGCGAAACTAGTGTCCCCAAGTGCTGGCTGTC ACCAATGGTTCTTACTTAAATGAGACCCACTTCAGT GATCAAATCGAACAGGAAGCCGATAACATGATTAC AGAGATGTTGAGGAAGGATTACATAAAGAGGCCAGG GGAGTACCCCCCTAGCATTGATGGACCTCTGATGT TTTCCACATCTGCATATCTAGTCAGCATCTCCTGCA CCTTGTCAAAATACCAACACACAGGCACATAAAAG GTGGCTCATGTCCAAAGCCACACCGATTAACCAACA AAGGAATTGTAGTTGTGGTGCATTAAAGGTGCCTG GTGTAAAAACCGTCTGGAAAAGACGCTGA
50	Envoltura; FPV	ATGAACACTCAAATCCTGGTTTCGCCCTGTGGCA GTCATCCCCACAAATGCAGACAAAATTGTCTTGGAA CATCATGCTGTATCAAATGGCACCAAAGTAAACAC ACTCACTGAGAGAGGGAGTAGAAGTTGTCAATGCAA CGGAAACAGTGGAGCGGACAAACATCCCCAAAATT TGCTCAAAAGGGAAAAGAACCAACTGATCTGGCCA ATGCGGACTGTTAGGGACCATTACCGGACCACCTCA ATGCGACCAATTCTAGAATTTCAGCTGATCTAAT AATCGAGAGACGAGAAGGAAATGATGTTGTTACC CGGGGAAGTTGTTAATGAAGAGGCATTGCGACAA ATCCTCAGAGGATCAGGTGGGATTGACAAAGAAC AATGGGATTCACATATAGTGGAATAAGGACCAACG GAACAACTAGTGCATGTAGAAGATCAGGTCTTCAT TCTATGCAGAAATGGAGTGGCTCCTGTCAAATACAG ACAATGCTGCTTCCCACAAATGACAAAATCATACA AAAACACAAGGAGAGAATCAGCTCTGATAGTCTGG GGAATCCACCAATTCAAGGATCAACCACCGAACAGAC CAAACATATGGGAGTGGAAATAACTGATAACAG

## ES 2 965 357 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		TCGGGAGTCCAAATATCATCAATCTTGCGGA GCCAGGAACACGACCGCAGATAAATGCCAGTCC GGACGGATTGATTTCATTGGTGATCTGGATCCC AATGATAACAGTTACTTTAGTTCAATGGGCTTC ATAGCTCAAATCGGCCAGCTCTGAGGGAAAG TCCATGGGATCCAGAGCGATGTGCAGGTTGATGCC AATTGCGAAGGGAAATGCTACCACAGTGGAGGGAC TATAACAAGCAGATTGCCCTTCAAAACATCAATAG CAGAGCAGTGGCAAATGCCAAGATATGAAAAC AGGAAAGTTATTATTGGCAACTGGATGAAGAAC GTTCCCGAACCTTCCAAAAAAAGGAAAAAAAGAGG CCTGTTGGCGCTATAGCAGGGTTATTGAAATGG TTGGGAAGGTCTGGTCGACGGTGGTACGGTTTCAG GCATCAGAATGCACAAGGAGAAGGAAGTGCAGCAG ACTACAAAAGCACCAATCGGCAATTGATCAGATA ACCGGAAAGTTAAATAGACTCATTGAGAAAACCAA CCAGCAATTGAGCTAATAGATAATGAATTCACTGA GGTGGAAAAGCAGATTGGCAATTAAATTAACTGGA CCAAAGACTCCATCACAGAAGTATGGCTTACAATG CTGAACCTTGTGGCAATGGAAAACAGCACACTA TTGATTGGCTGATTAGAGATGAACAAGCTGTATG AGCGAGTGAGGAAACAATTAGGGAAAATGCTGAA GAGGATGGCACTGGTGTGGCTTGAAATTTCATAAA TGTGACGATGATTGTATGGCTAGTATAAGGAACAAT ACTTATGATCACAGCAAATACAGAGAAGAAGCGAT GCAAAATAGAATAACAAATTGACCCAGTCAAATTGA GTAGTGGCTACAAAGATGTGATACTTGGTTAGCT TCGGGGCATCATGCTTTGCTTGTGCCATTGCAAT GGCCTGTTTATGTGTGAAGAACGGAAACAT GCGGTGCACTATTGTATATAA
51	Envoltura; RRV	AGTGTAAACAGAGCACCTTAATGTGTATAAGGCTACT AGACCATACTAGCACATTGCGCCATTGCGGGGA CGGGTACTCTGCTATAGCCCAGTTGCTATCGAGGA

## ES 2 965 357 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GATCCGAGATGAGGCCTGTGATGGCATGCTTAAGAT CCAAGTCTCCGCCAAATAGGTCTGGACAAGGCAG GCACCCACGCCACACGAAGCTCCGATATGGCTG GTCATGATGTTCAAGGAATCTAAGAGAGAATTCCITGA GGGTGTACACGTCCGCAGCGTGCTCCATACATGGGA CGATGGGACACTTCATCGTCGCACACTGTCCACCAG GCGACTACCTCAAGGTTCGTCGAGGACGCAGATT CGCACGTGAAGGCATGTAAGGTCCAATACAAGCAC AATCCATTGCCGGTGGGTAGAGAGAAGTTCGTGGTT AGACCACACTTGGCGTAGAGCTGCCATGCACCTCA TACCAAGCTGACAACGGCTCCCACCGACGAGGAGAT TGACATGCATACACCGCCAGATATACCGGATCGCAC CCTGCTATCACAGACGGCGGGCAACGTAAAATAA CAGCAGGCAGGACTATCAGGTACAACACTGTACC TGCAGCGTGACAACGTAGGCACCTACCAAGTACTGA CAAGACCATCAACACATGCAAGATTGACCAATGCC ATGCTGCCGTACCAAGCCATGACAAATGGCAATTAA CCTCTCCATTGTTCCAGGGCTGATCAGACAGCTA GGAAAGGCAAGGTACACGTTCCGGCTGACTA ACGTCACCTGCCAGTGCCGTTGGCTCGAGCGCCGG ATGCCACCTATGGTAAGAAGGAGGTGACCCCTGAGA TTACACCCAGATCATCCGACGCTTCTCCTATAGG AGTTAGGAGCCGAACCGCACCGTACGAGGAATG GGTGACAAGTTCTGTAGCGCATCATCCAGTGAC GGAAGAAGGGATTGAGTACCAAGTGGGGCAACAAACC CGCCGGTCTGCCTGTGGCGCAACTGACGACCGAG GGCAAACCCATGGCTGGCCACATGAAATCATTCA GTACTATTATGGACTATAACCCGCCCACTATTGC CGCAGTATCCGGGGCGAGTCTGATGGCCCTCTAAC TCTGGCGGCCACATGCTGCATGCTGGCCACCGCGAG GAGAAAGTGCCTAACACCGTACGCCCTGACGCCAG GAGCGGTGGTACCGTTGACACTGGGGCTGCTTGCT GCGCACCGAGGGCGAATGCA

(continuación)

<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Descripción</b>	<b>Secuencia</b>
52	Envoltura; MLV 10A1	AGTGTAAACAGAGCACTTAATGTGTATAAGGCTACT AGACCATAACCTAGCACATTGCCCGATTGGGGGA CGGGTACTTCTGCTATAGCCCAGTTGCTATCGAGGA GATCCGAGATGAGGCCTCTGATGGCATGCTTAAGAT CCAAGTCTCCGCCAAATAGGTCTGGACAAGGCAG GCACCCACGCCAACACGAAGCTCCGATATATGGCTG GTCATGATGTTAGGAATCTAAGAGAGATTCTTGA GGGTGTACACGTCCGCAGCGTGCTCCATACATGGGA CGATGGGACACTTCATCGTCGACACTGTCCACCAG GCGACTACCTCAAGGTTCGTCGAGGACGCAGATT CGCACGTGAAGGCATGTAAGGCTCAATACAAGCAC AAATCCATTGCCGGTGGGTAGAGAGAAGTICGTGGTT AGACCACACTTGGCGTAGAGCTGCCATGCACCTCA TACCAAGCTGACAACGGCTCCCACCGACGAGGAGAT TGACATGCATACACCGCCAGATATAACCGATCGCAC CCTGCTATCACAGACGGCGGGCAACGTCAAATAA CAGCAGGCGGCAGGACTATCAGGTACAACGTACCC TGGGCCGTGACAACGTAGGCACCTACAGTACTGA CAAGACCATCAACACATGCAAGATTGACCAATGCC ATGCTGCCGTCAACCAGCCATGACAATGGCAATTAA CCTCTCCATTGTTCCCAGGGCTGATCAGACAGCTA GGAAAGGCAAGGTACACGTTCCGTTCCCTGACTA ACGTCACCTGCCGAGTGCGTTGGCTCGAGCGCCGG ATGCCACCTATGGTAAGAAGGAGGTGACCTGAGA TTACACCCAGATCATCCGACGCTTCTCCTATAGG AGTTTAGGAGCCGAACCGCACCGTACGAGGAATG GGTGACAAGTTCTCTGAGCGCATCATCCAGTGAC GGAAGAAGGGATTGAGTACCAAGTGGGGCAACAACC CGCCGGTCTGCCGTGGCGCAACTGACGGACCGAG GGCAAACCCATGGCTGGCCACATGAAATCATTCA GTACTATTATGGACTATACCCCGCCGCACTATTGC CGCAGTATCCGGGGCGAGTCTGATGGCCCTCTAAC TCTGGCGGCCACATGCTGCATGCTGGCCACCGCGAG

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GAGAAAGTGCCTAACACCGTACGCCCTGACGCCAG GAGCGGTGGTACCGTTGACACTGGGGCTGCTTGCT GCGCACCGAGGGCGAATGCA
53	Envoltura; Ébola	ATGGGTGTTACAGGAATATTGCAGTTACCTCGTGAT CGATTCAAGAGGACATCATTCTTCTTGGTAATT ATCCTTTCAAAGAACATTCCATCCCAC TTGGA GTCATCCACAATAGCACATTACAGGTAGTGATGTC GACAAACTGGTTGCCGTGACAAACTGTCATCCACA AATCAATTGAGATCAGTGGACTGAATCTCGAAGG GAATGGAGTGGCAACTGACGTGCCATCTGCAACTA AAAGATGGGGCTTCAGGTCCGGTGTCCCACCAAAG GTGGTCAATTATGAAGCTGGTGAATGGGCTGAAAAA CTGCTACAATCTTCAAATCAAAAACCTGACGGGA GTGAGTGTCTACCAGCAGGCCAGACGGGATTGG GGCTCCCCCGGTGCCGGTATGTGCACAAAGTATCA GGAACGGGACCGTGTGCCGGAGACTTGCCTCCAC AAAGAGGGTGCTTCTCCTGTATGACCGACTTGCT TCCACAGTTATCTACCGAGGAACGACTTCGCTGAA GGTGTGTTGCATTCTGATACTGCCCAAGCTAAG AAGGACTTCTCAGCTCACACCCCTGAGAGAGCCG GTCAATGCAACGGAGGGACCCGTCTAGTGGCTACTAT TCTACCACAATTAGATATCAAGCTACCGGTTGGAA ACCAATGAGACAGAGTATTGTTCGAGGTTGACAAT TTGACCTACGTCCAACCTGAATCAAGATTACACCA CAGTTCTGCTCCAGCTGAATGAGACAATATACA AGTGGGAAAGGAGCAATACCACGGAAAACATAAT TTGGAAGGTCAACCCGAAATTGATACAACAATCG GGGAGTGGGCCTCTGGGAAACTAAAAAAACCTCA CTAGAAAAATTGCGAGTGAAGAGTTGTCTTCACAG CTGTATCAAACAGAGCCAAAACATCAGTGGTCAG AGTCCGGCGCGAACCTCTCCGACCCAGGGACCAAC ACAACAACTGAAGACCACAAAATCATGGCTTCAGA AAATTCCCTGCAATGGTCAAGTGCACAGTCAAGG

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		AAGGGAAGCTGCAGTGTGCATCTGACAACCCCTTGC CACAATCTCCACGAGTCCTCAACCCCCCACAAACCAA ACCAGGTCCGGACAACAGCACCCACAATAACACCCG TGTATAAACTTGACATCTTGAGGCAACTCAAGTTG AACAAACATCACCGCAGAACAGACAACGACAGCACA GCCTCCGACACTCCCCCGCCACGACCGCAGCCGGA CCCCTAAAAGCAGAGAACACCAACACGAGCAAGGG TACCGACCTCCTGGACCCCCGCCACCACAACAAGTCC CCAAAACCACAGCGAGACCGCTGGCAACAAACAACA CTCATCACCAAGATAACCGGAGAACAGAGAGTGCCAGC AGCGGGAAAGCTAGGCTTAATTACCAATACTATTGCT GGAGTCGCAGGACTGATCACAGGCGGGAGGAGAGC TCGAAGAGAACAGCAATTGTCATGCTCAACCCAAAT GCAACCCCTAATTACATTACTGGACTACTCAGGATG AAGGTGCTGCAATCGGACTGGCCTGGATACCATATT TCGGGCCAGCAGCCGAGGGATTACATAGAGGGG CTGATGCACAATCAAGATGGTTAATCTGTGGGTTG AGACAGCTGCCAACGAGAGACTCAAGCTCTCA ACTGTTCTGAGAGGCCACAACCGAGCTACGCACCTT TTCAATCCTCAACCGTAAGGCAATTGATTCTTGCT GCAGCGATGGGCGGCACATGCCACATTTGGAC CGGACTGCTGTATCGAACCCACATGATTGGACCAAG AACATAACAGACAAAATTGATCAGATTATTATGAT TTTGTGATAAAACCCCTCCGGACCAGGGGACAAT GACAATTGGTGGACAGGATGGAGACAATGGATACC GGCAGGTATTGGAGTTACAGGCCTATAATTGCAGT TATCGCTTATTCTGTATATGCAAATTGTCTTTAG
54	promotores de ARNh de la polimerasa III; promotor U6	TTTCCCATGATTCTCATATTGCATATACGATACA AGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTGACTG TAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGT AGAAAGTAATAATTCTGGTAGTTGCAGTTA AAATTATGTTAAAATGGACTATCATATGCTTAC GTAACCTGAAAGTATTCGATTCTGGCTTATATA

(continuación)

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		TCTTGTGGAAAGGACGAAAC
55	promotores de ARNhC de la polimerasa III; promotor 7SK	CTGCAGTATTAGCATGCCCAACCCTTGCAAGGC ATTCTGGATAGTGTCAAAACAGCCGAAATCAAGT CCGTTATCTCAAACCTTAGCATTGGAAATAAT GATATTGCTATGCTGGTAAATTAGATTAGTTA AATTTCCTGCTGAAGCTCTAGTACGATAAGCAACTT GACCTAAGTGTAAAGTTGAGATTTCCTCAGGTTA TATAGCTTGTGCGCCGCCTGGCTACCTC
56	Secuencia diana n.º 1 de FDPS	GTCCTGGAGTACAATGCCATT
57	Secuencia diana n.º 2 de FDPS	GCAGGATTCGTTAGCAGCACTT
58	Secuencia diana n.º 3 de FDPS	GCCATGTACATGGCAGGAATT
59	Secuencia diana n.º 4 de FDPS	GCAGAAGGAGGGCTGAGAAAGT
60	Secuencia no dirigida	GCCGCTTGTAGGATAGAGCTCGAGCTCTATCCTAC AAAGCGGCTTTT
61	Cebador directo	AGGAATTGATGGCGAGAAGG
62	Cebador inverso	CCCAAAGAGGTCAAGGTAATCA
63	Cebador directo	AGCGCGGCTACAGCTTCA
64	Cebador inverso	GGCGACGTAGCACAGCTTCT
65	Repetición terminal invertida izquierda (ITR izquierda)	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGCCCCGGCGTCGGCGACCTTGGTCGCCGGCC TCAGTGAGCGAGCGAGCGCGAGAGAGGGAGTGGC CAACTCCATCACTAGGGGTTCC
66	Repetición terminal invertida derecha (ITR derecha)	GAGCGGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC CACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGC CGGGCGACCAAGGTCGCCGACGCCGGCTTG CCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGC TGCCTGCAGG

**REIVINDICACIONES**

- 5        1. Un vector vírico que comprende al menos un elemento genético codificado, para su uso en el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa, en donde el al menos un elemento genético codificado comprende un ARN pequeño que, cuando se expresa, se dirige y reduce los niveles de expresión de farnesil difosfato sintasa (FDPS), en donde el ARN pequeño tiene una longitud de 200 nucleótidos o menos y posee una función silenciadora o de interferencia.
- 10      2. El vector vírico para el uso de la reivindicación 1, en donde al menos un elemento genético codificado comprende un microARN o un ARNhC.
- 15      3. El vector vírico para el uso de la reivindicación 2, en donde el ARNhC comprende una secuencia que tiene al menos un 80 %, o al menos un 85 %, o al menos un 90 %, o al menos un 95 % de identidad con:
- a. GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGG  
          ACTTTTT (SEQ ID NO: 1);
- b. GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCT  
          GCTTTTT (SEQ ID NO: 2);
- c. GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCCTGCCATGTACATG  
          GCTTTTT (SEQ ID NO: 3);
- 25      d. GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTTCT  
          GCTTTTT (SEQ ID NO: 4);
- 30      preferentemente, en donde el ARNhC comprende:
- a. GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGG  
          ACTTTTT (SEQ ID NO: 1);
- 35      b. GCAGGATTCGTTCAGCACTTCTCGAGAAGTGCTGAACGAAATCCT  
          GCTTTTT (SEQ ID NO: 2);
- 40      c. GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATTCCCTGCCATGTACATG  
          GCTTTTT (SEQ ID NO: 3);
- 45      d. GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTTCT  
          GCTTTTT (SEQ ID NO: 4).
- 50      4. El vector vírico para el uso de la reivindicación 2, en donde el microARN comprende una secuencia que tiene al menos un 80 %, o al menos un 85 %, o al menos un 90 %, o al menos un 95 % de porcentaje de identidad con:

a.

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTTC  
TGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCT  
ACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO: 5);

5

b.

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTTC  
TGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCT  
ACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO: 6);

10

c.

TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAGCC  
ACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCCTACTGCCTCGGA  
(SEQ ID NO: 7);

15

d.

CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTCTCAGCCTCCTTC  
TGCTTTGCCACTGACTGAGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCAGGACA  
CAAGGCCTGTTACTAGCACTCA (SEQ ID NO: 8);

20

e.

CATCTCCATGGCTGTACCACCTTGTGGACTTCTCAGCCTCCTTCT  
GCCTGTTGAATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATT  
TGGTATCTTCATCTGACCA (SEQ ID NO: 9);

f.

25

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTCTCAGCCTCCTT  
CTGCTGGTCCCCTCCCCGAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTCCCTC  
CCAATGACCGCGTCTCGTCG (SEQ ID NO: 10);

preferentemente, en donde el microARN comprende:

30

a.

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTTC  
TGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCT  
ACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO: 5);

b.

35

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTTC  
TGCGTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCCT  
ACTGCCTCGGACTTCAAGGGGCT (SEQ ID NO: 6);

c.

TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAGCC  
ACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGA AAGTTGCCTACTGCCTCGGA  
(SEQ ID NO: 7);

d.

5 CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTCTCAGCCTCCTTC  
TGCTTTGGCCACTGACTGAGCAGAAGGGCTGAGAAAGTCAGGACA  
CAAGGCCTGTTACTAGCACTCA (SEQ ID NO: 8);

e.

10 CATCTCCATGGCTGTACCACCTGTCGGACTTCTCAGCCTCCTTCT  
GCCTGTTGAATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATT  
TGGTATCTTCATCTGACCA (SEQ ID NO: 9);

f.

15 GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTCTCAGCCTCCTT  
CTGCTGGTCCCCTCCCCGAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTCCCTC  
CCAATGACCGCGTCTCGTCG (SEQ ID NO: 10).

- 15 5. El vector vírico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el vector vírico es un vector lentivírico; o en donde el vector vírico es un vector vírico adenoasociado (AAV).
- 20 6. El vector vírico para el uso de la reivindicación 1, que comprende además un segundo elemento genético codificado, en donde el segundo elemento genético comprende al menos una citocina o quimiocina; preferentemente, en donde la al menos una citocina se selecciona del grupo que consiste en: IL-18, TNF-a, interferón- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-15, IL-17 e IL-12; o preferentemente, en donde al menos una quimiocina es una quimiocina CC, una quimiocina CXC, una quimiocina CX3C o una quimiocina XC.
- 25 7. Una partícula lentivírica capaz de infectar una célula, para su uso en el tratamiento del cáncer o una enfermedad infecciosa, comprendiendo la partícula lentivírica una proteína de envoltura optimizada para infectar una célula diana, y un vector lentivírico de acuerdo con la reivindicación 5.
- 30 8. La partícula lentivírica para el uso de la reivindicación 7, en donde la proteína de la envoltura está optimizada para infectar una célula diana, y en donde la célula diana es una célula cancerosa o en donde la célula diana es una célula que está infectada con una enfermedad infecciosa.
- 35 9. Un método *ex vivo* para activar un linfocito T gamma delta, comprendiendo el método infectar, en presencia del linfocito T GD, una célula diana con un sistema de suministro vírico que codifica al menos un elemento genético, en donde el al menos un elemento genético codificado comprende un ARN pequeño que, cuando se expresa, se dirige y reduce los niveles de expresión de farnesil difosfato sintasa (FDPS), en donde el ARN pequeño tiene una longitud de 200 nucleótidos o menos y posee una función silenciadora o de interferencia, y en donde, cuando la enzima se inhibe en la célula diana, la célula diana activa el linfocito T GD.
- 40 10. Un sistema de suministro vírico que codifica al menos un elemento genético, en donde el al menos un elemento genético codificado comprende un ARN pequeño que, cuando se expresa, se dirige y reduce los niveles de expresión de farnesil difosfato sintasa (FDPS), en donde el ARN pequeño tiene una longitud de 200 nucleótidos o menos y posee una función silenciadora o de interferencia, para su uso en la activación de un linfocito T GD en un sujeto, en donde, en presencia del linfocito T GD, cuando la célula diana en el sujeto está infectada con el sistema de suministro vírico, y la enzima se inhibe en la célula diana, la célula diana activa el linfocito T GD.
- 45 11. Un sistema de suministro vírico que codifica al menos un elemento genético, en donde el al menos un elemento genético codificado comprende un ARN pequeño que, cuando se expresa, se dirige y reduce los niveles de expresión de farnesil difosfato sintasa (FDPS), en donde el ARN pequeño tiene una longitud de 200 nucleótidos o menos y posee una función silenciadora o de interferencia, para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, y en donde, cuando la enzima se inhibe en una célula cancerosa en presencia de un linfocito T GD, la célula cancerosa activa el linfocito

T GD, para así tratar el cáncer.

12. El método de la reivindicación 9, o el sistema de suministro vírico para el uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en donde al menos un elemento genético codificado comprende un microARN o un ARNhC; preferentemente, en 5 donde el ARNhC comprende una secuencia que tiene al menos un 80 %, o al menos un 85 %, o al menos un 90 %, o al menos un 95 % de identidad con:

a.

GTCCTGGAGTACAATGCCATTCTCGAGAATGGCATTGTACTCCAGG  
10 ACTTTT (SEQ ID NO: 1);

b.

GCAGGATT CGTT CAGC ACTT CT CGAGA AGT GCT GAAC GAA AT CCT  
15 GCTTTT (SEQ ID NO: 2);

c.

GCCATGTACATGGCAGGAATTCTCGAGAATT CCTGCCATGTACATG  
GCTTTT (SEQ ID NO: 3);

d.

GCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCTCGAGACTTCTCAGCCTCCTCT  
GCTTTT (SEQ ID NO: 4);

preferentemente, en donde el microARN comprende una secuencia que tiene al menos un 80 %, o al menos un 85 %, 25 o al menos un 90 %, o al menos un 95 % de identidad con:

a.

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTC  
TGCCTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTGCC  
30 T ACTGCCTCGGACTTCAAGGGCT (SEQ ID NO: 5);

b.

AAGGTATATTGCTGTTGACAGTGAGCGACACTTCTCAGCCTCCTC  
TGCCTGAAGCCACAGATGGCAGAAGGGCTGAGAAAGTGCTGCC  
AC TGCCTCGGACTTCAAGGGCT (SEQ ID NO: 6);

c.

TGCTGTTGACAGTGAGCGACTTCTCAGCCTCCTCTGCGTGAAGCC  
ACAGATGGCAGAAGGAGGCTGAGAAAGTGCTACTGCCTCGGA  
35 (SEQ ID NO: 7);

d.

CCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCTGACTTCTCAGCCTCCTC  
TGCTTTGCCACTGACTGAGCAGAAGGGCTGAGAAAGTCAGGAC  
ACAAGGCCTGTTACTAGCACTCA (SEQ ID NO: 8);

e.

CATCTCCATGGCTGTACCACCTGTCGGGACTTCTCAGCCTCCTCT  
GCCTGTTGAATCTCATGGCAGAAGGAGGCGAGAAAGTCTGACATT  
TGGTATCTTCATCTGACCA (SEQ ID NO: 9);

5

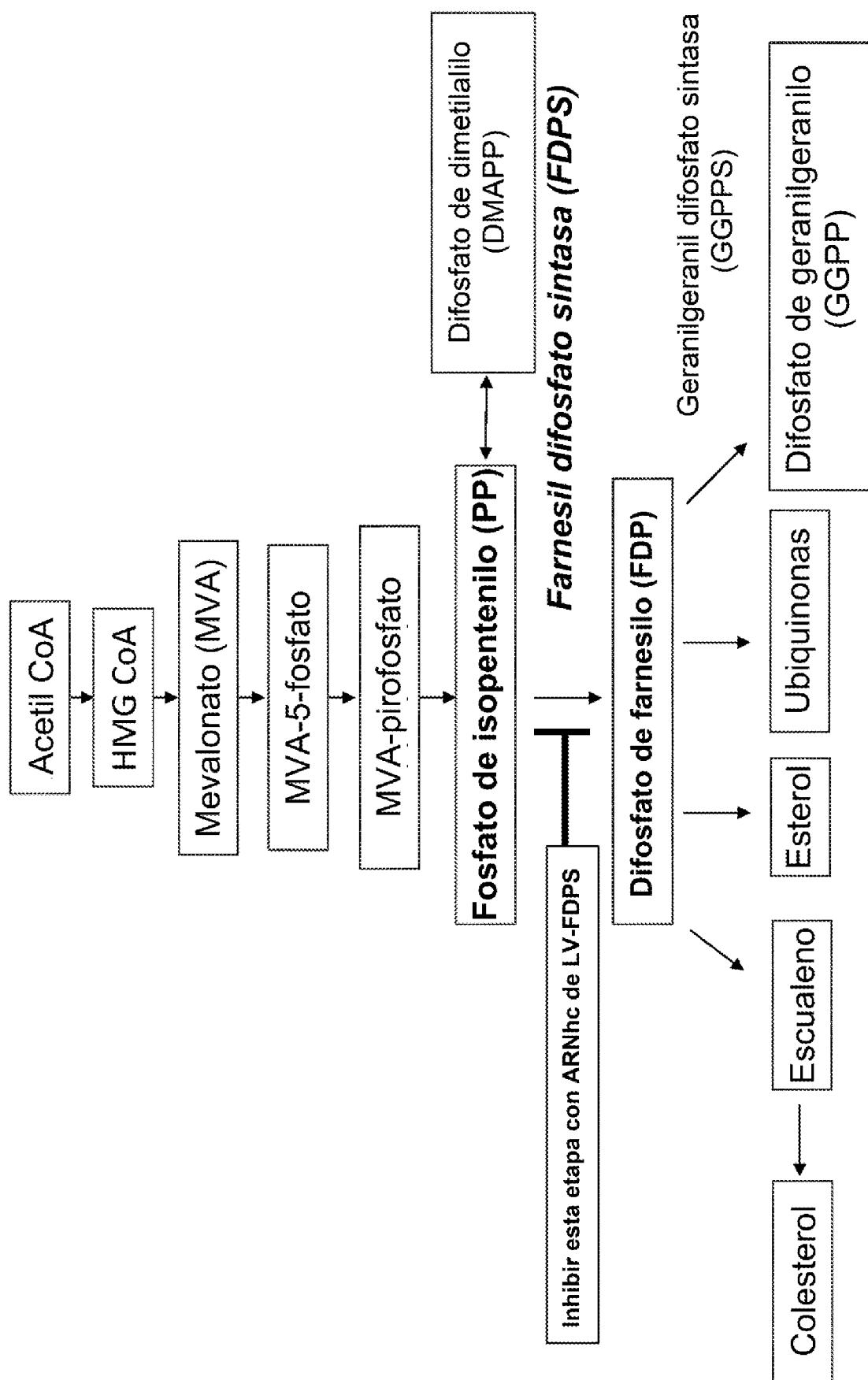
o

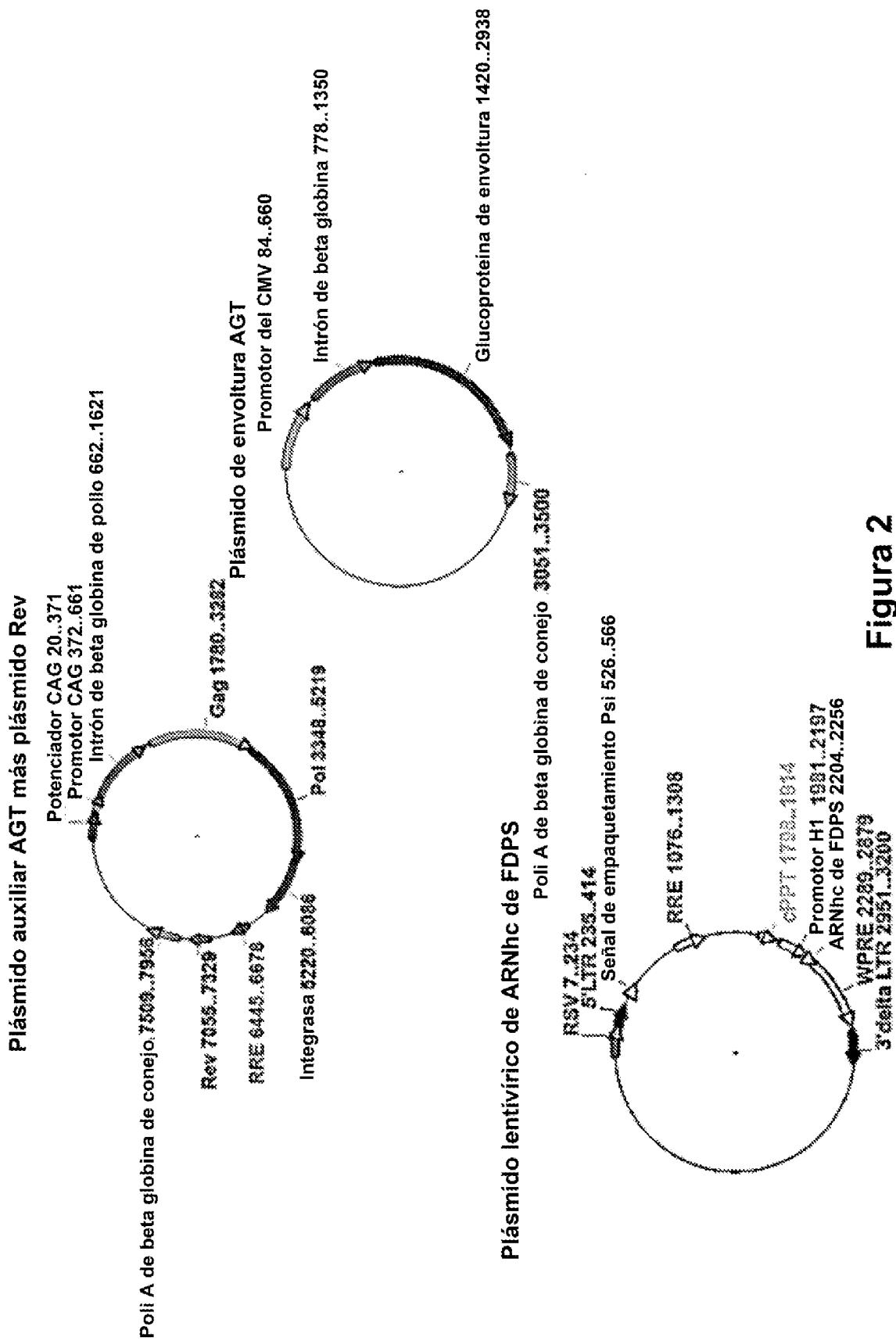
f.

GGGCCTGGCTCGAGCAGGGGGCGAGGGATACTTCTCAGCCTCCTT  
CTGCTGGTCCCCTCCCCGAGAAGGAGGCTGAGAAAGTCCTCCCTC  
CCAATGACCGCGTCTCGTCG (SEQ ID NO: 10).

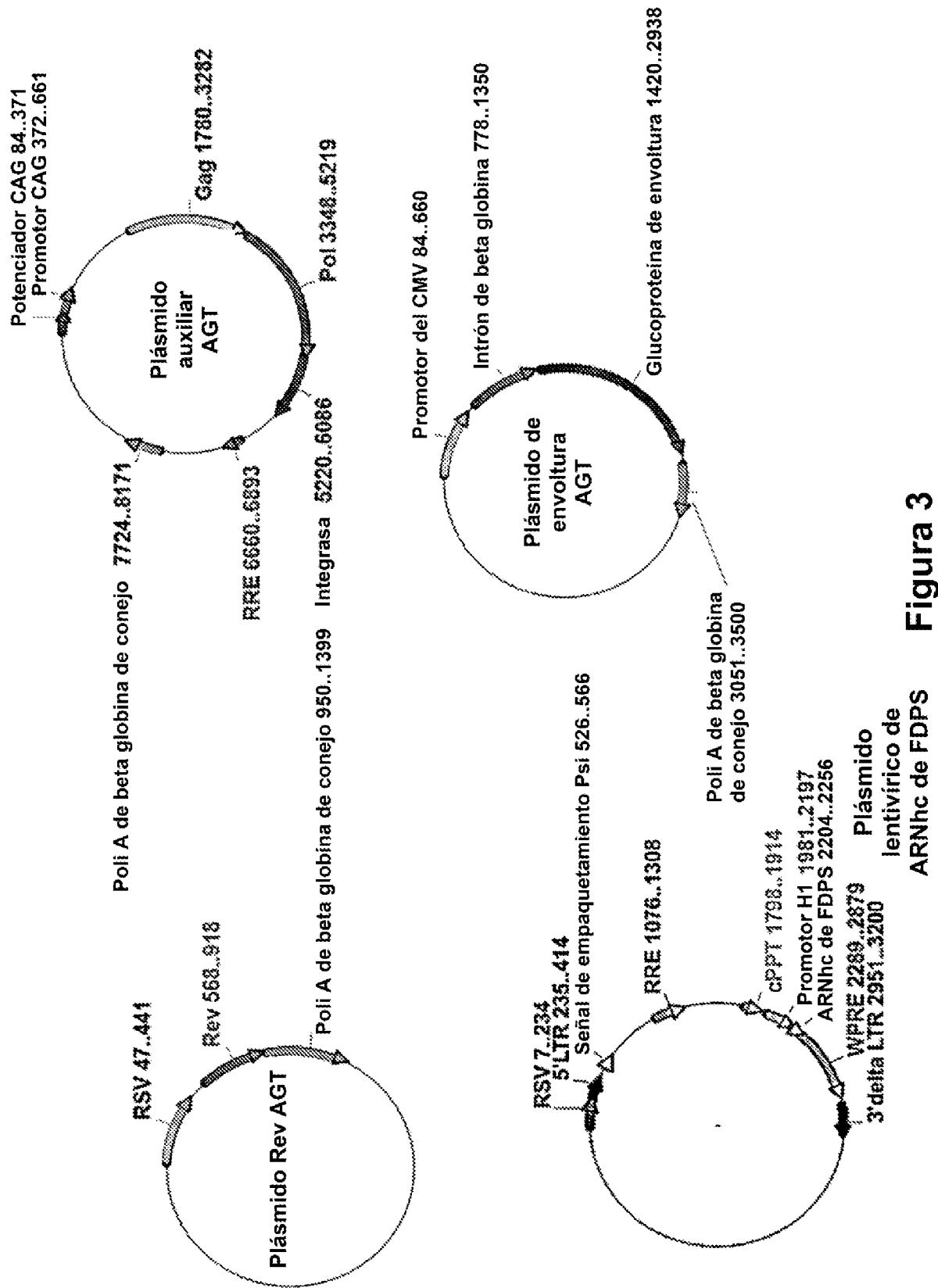
10

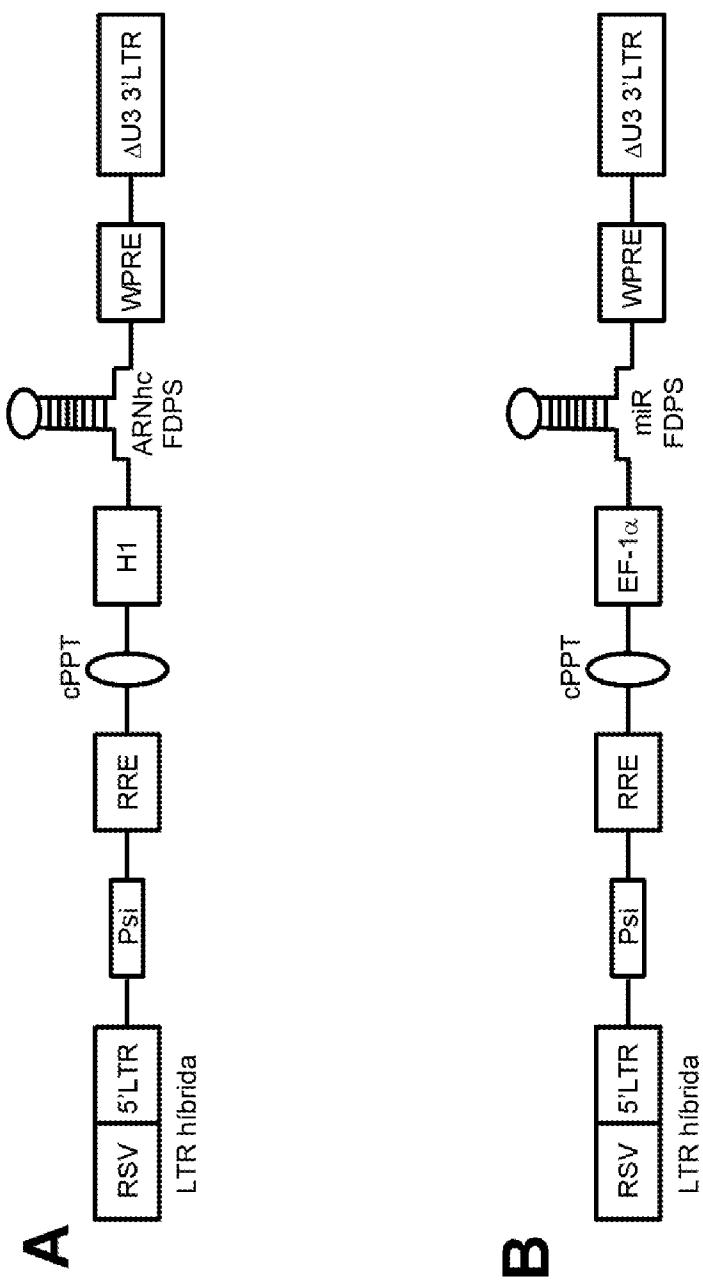
13. El sistema de suministro vírico para el uso de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, que comprende además administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco de aminobisfosfonato; preferentemente, en donde el fármaco de aminobisfosfonato es ácido zoledrónico.

**Figura 1**



**Figura 2**

**Figura 3**

**Figura 4**

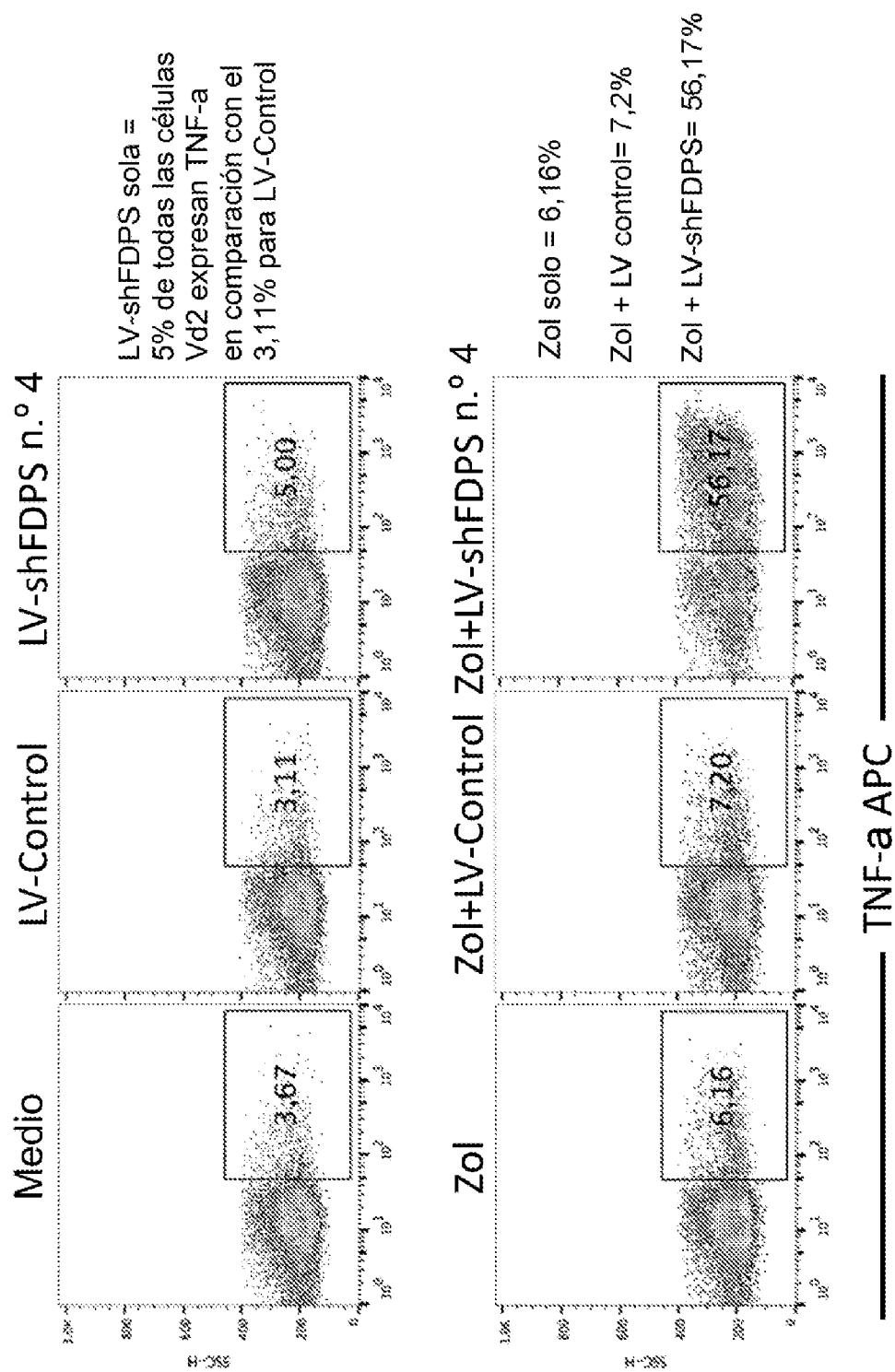
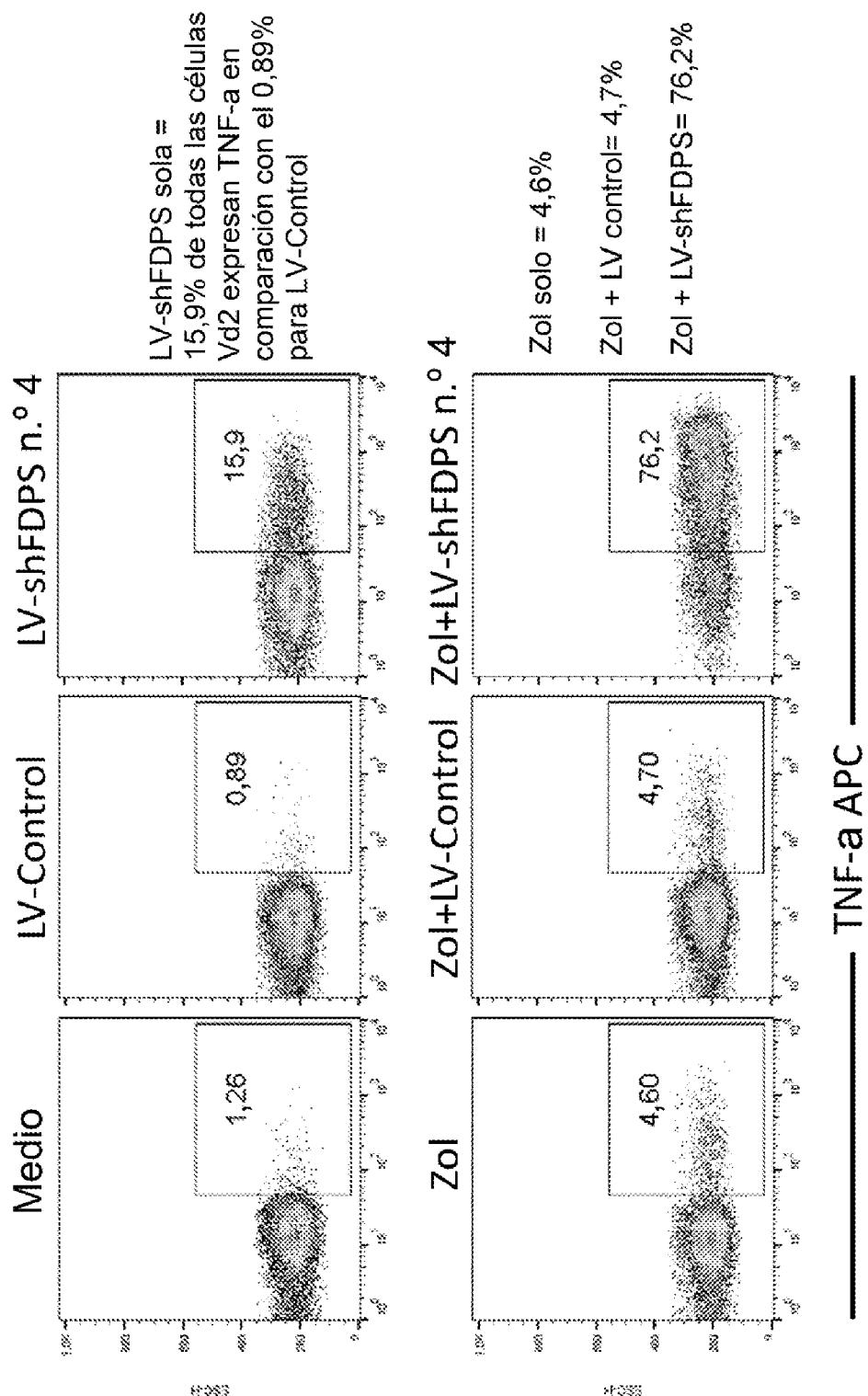
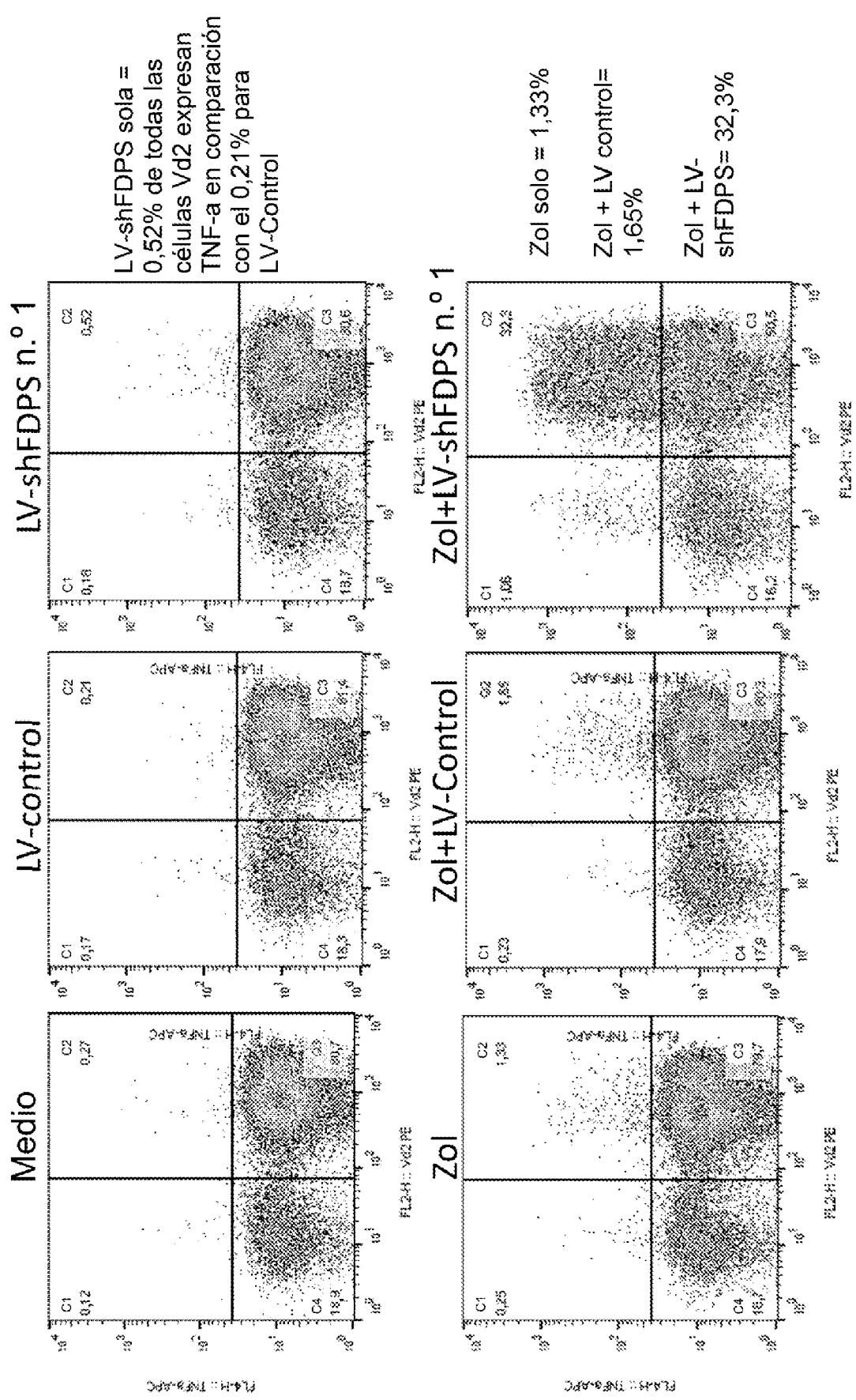
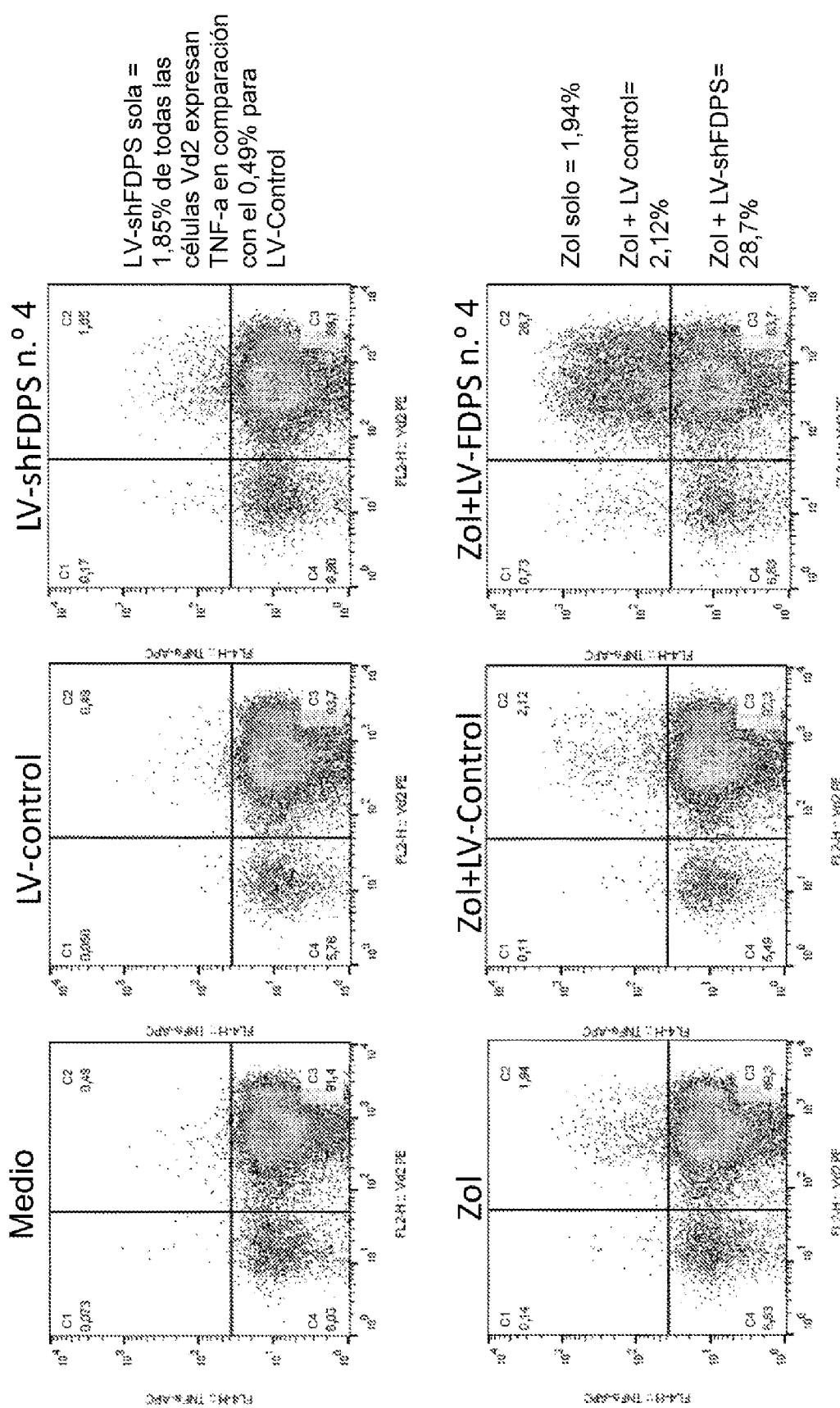
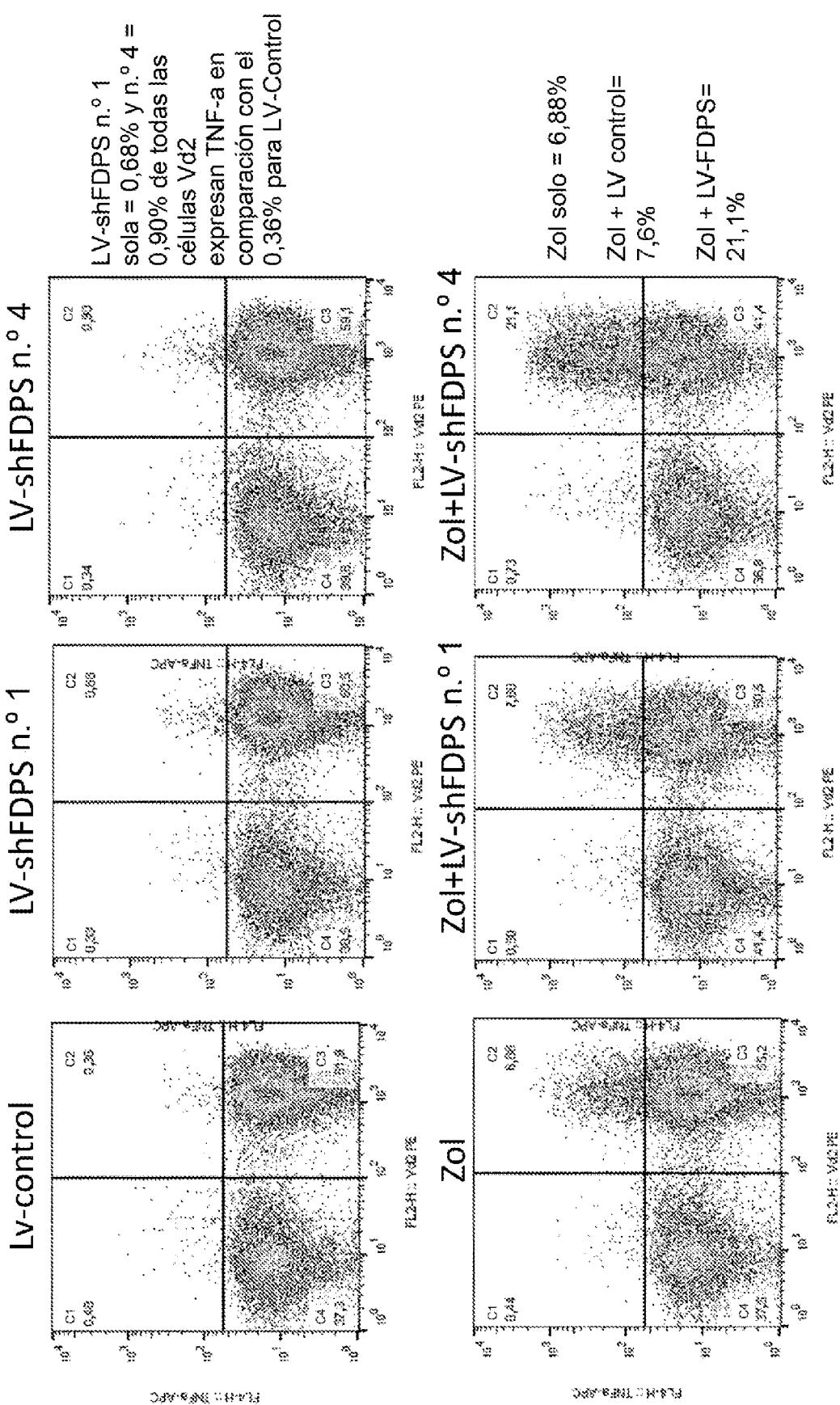


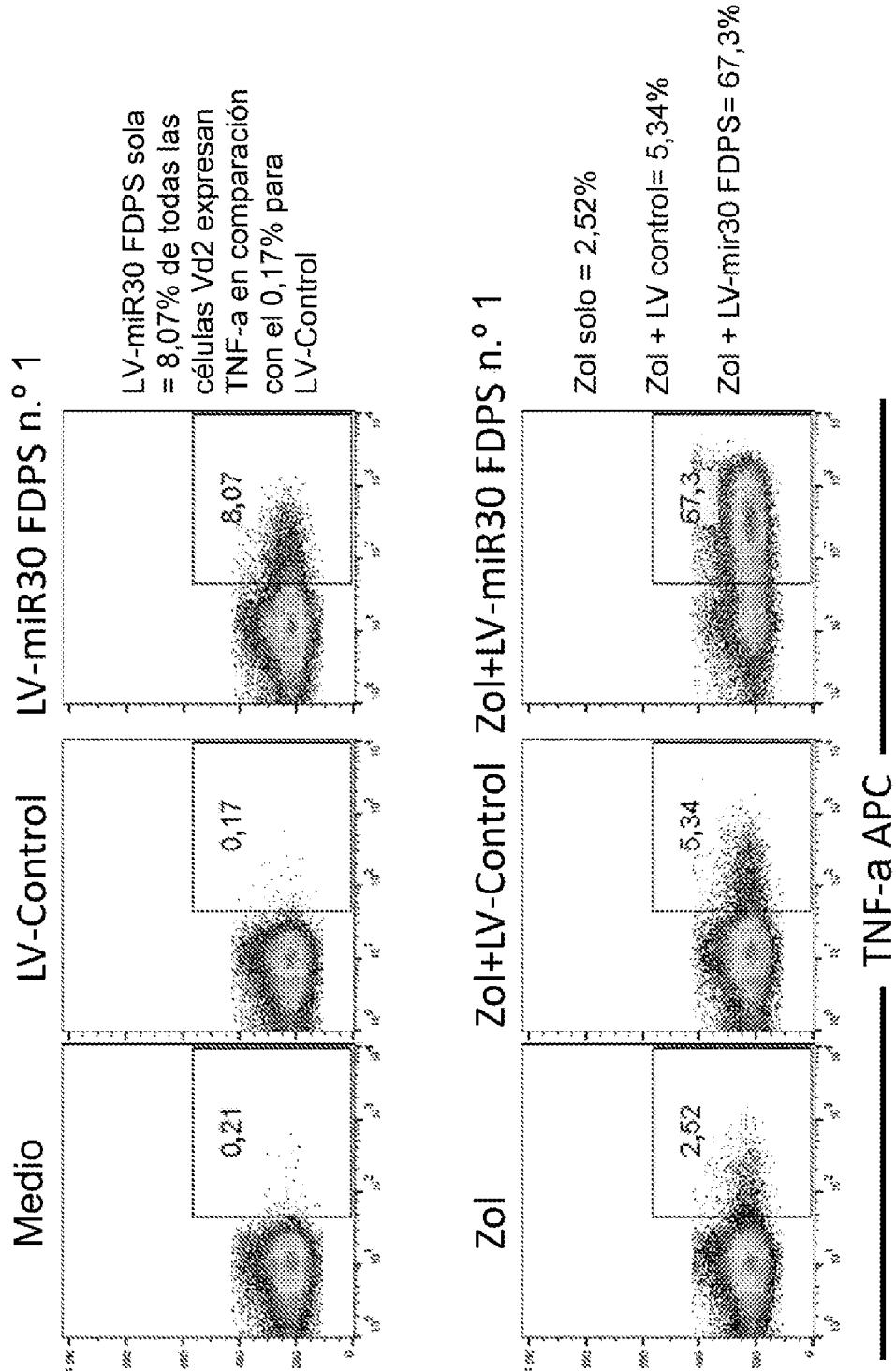
Figura 5

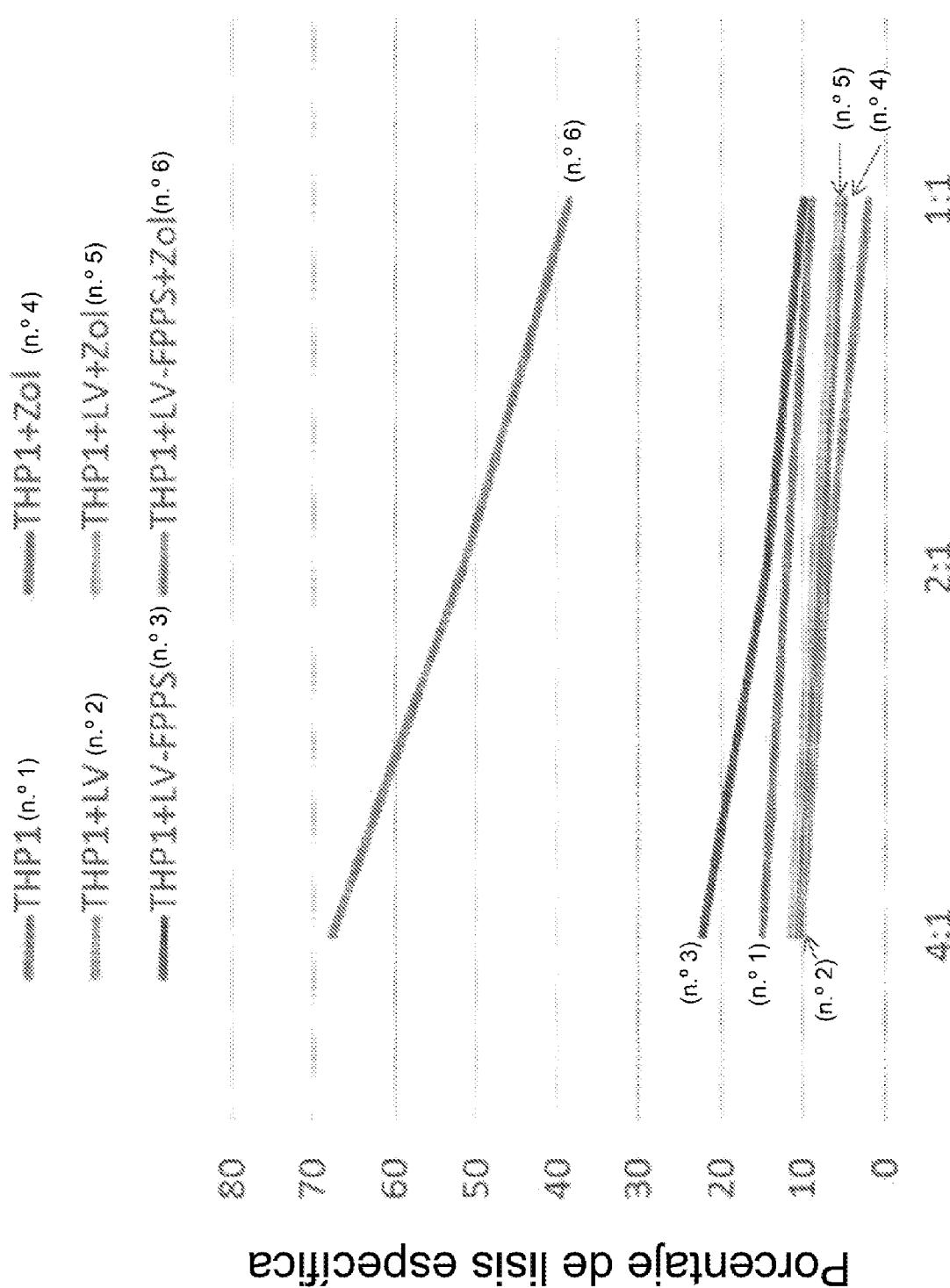
**Figura 6**

**Figura 7**

**Figura 8**



**Figura 10**



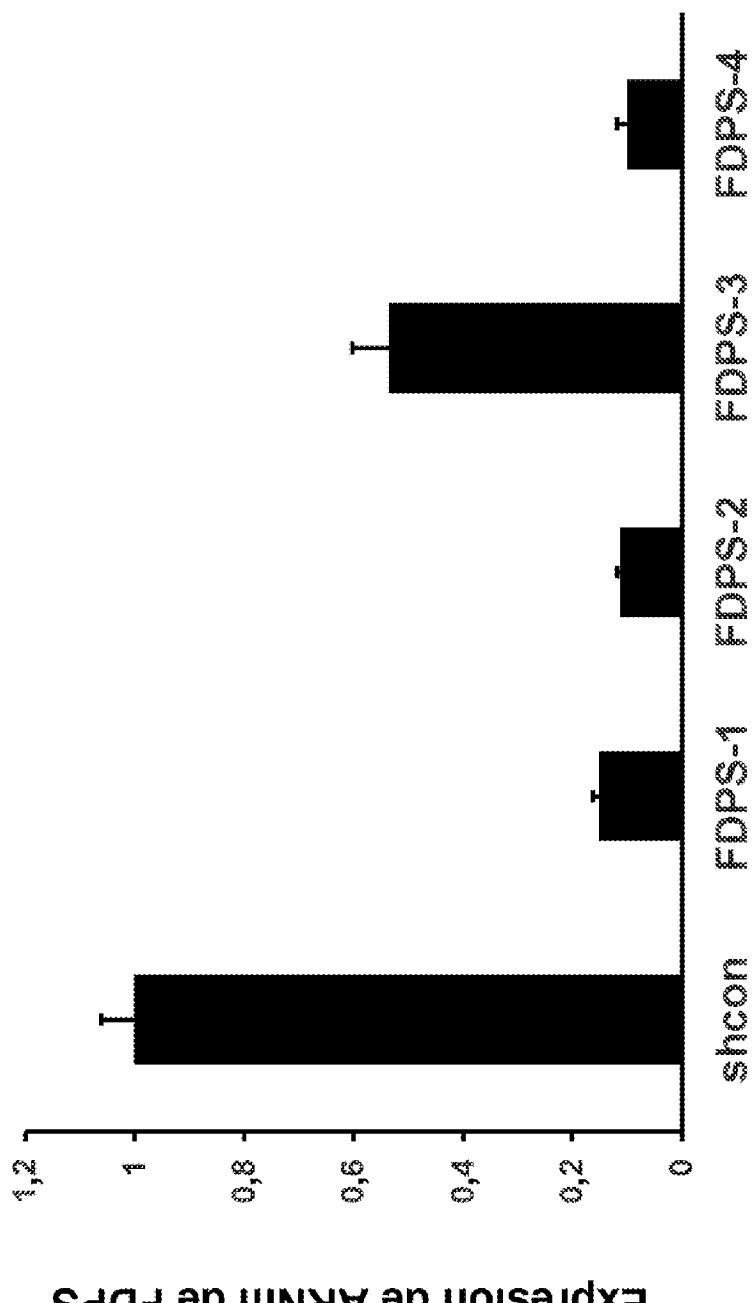
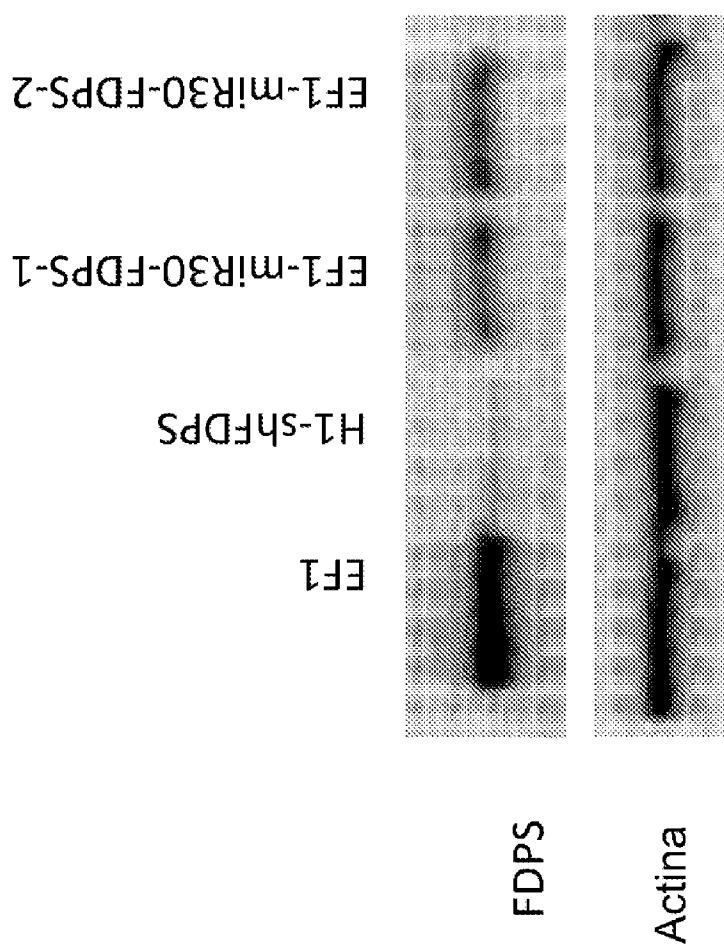
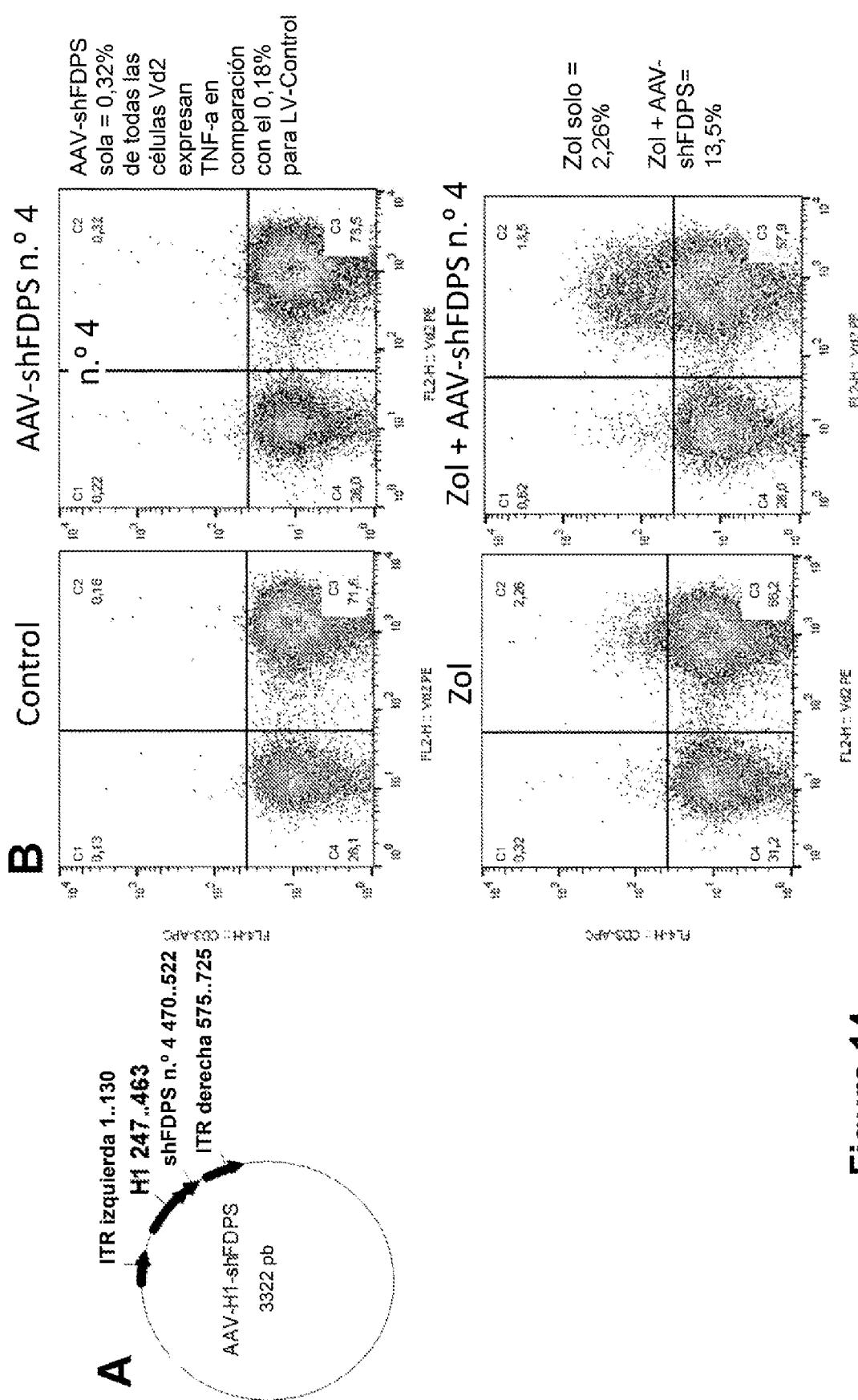


Figura 12



**Figura 13**



**Figura 14**

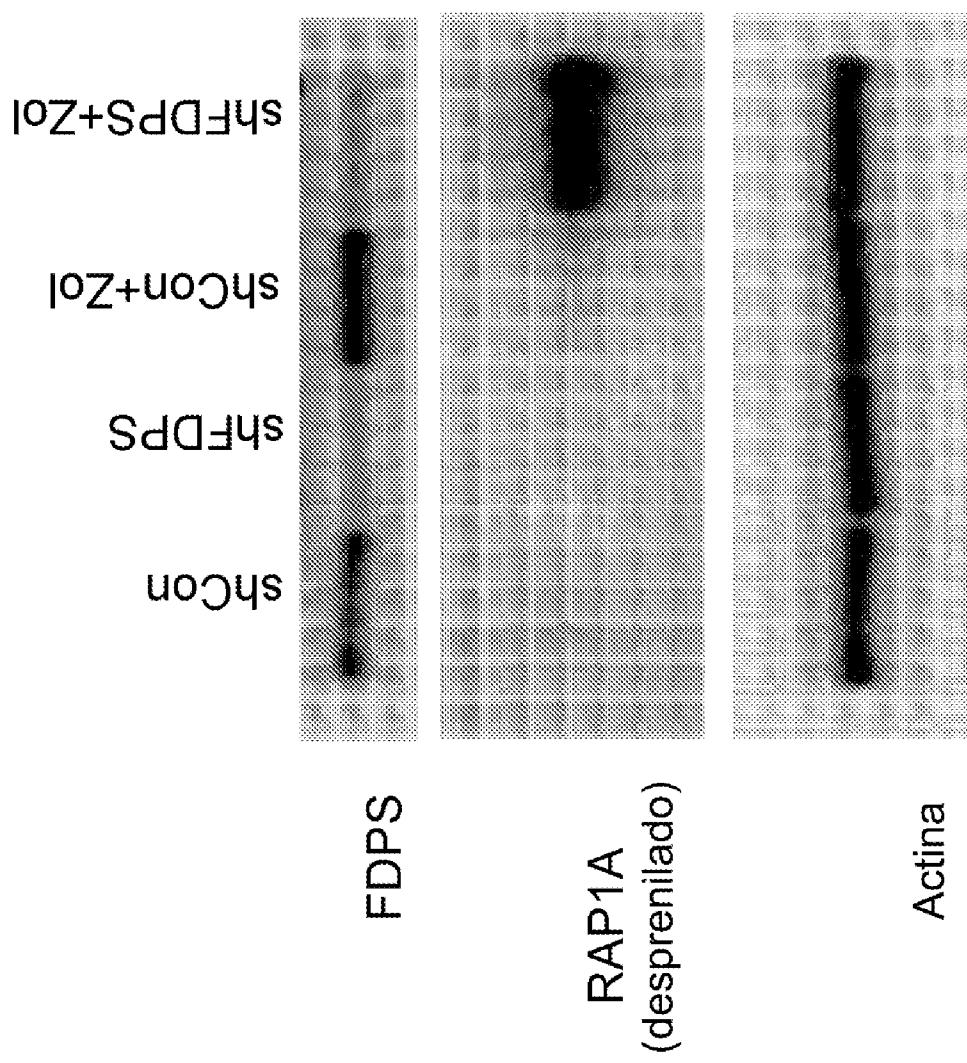


Figura 15