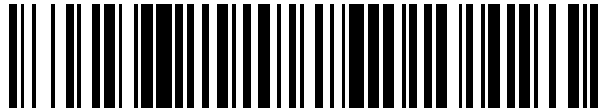


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 089**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/867** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2008 E 08786366 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 2171072**

54 Título: **Partículas de vector para dirigirse a células CD34+**

30 Prioridad:

**23.07.2007 EP 07290918**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.10.2013**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA  
RECHERCHE MEDICALE (100.0%)  
101 Rue de Tolbiac  
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**COSSET, FRANÇOIS-LOÏC;  
VERHOEYEN, ELS;  
COSTA, CAROLINE y  
FRECHA, CECILIA**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 426 089 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Partículas de vector para dirigirse a células CD34+

5 **[0001]** La presente invención se refiere a partículas de vector lentivírico previstas para la administración específica de ácidos nucleicos a células CD34+.

**[0002]** Para la corrección mediante terapia génica de muchos defectos heredados o adquiridos del sistema hematopoyético, el gen terapéutico debe administrarse a células capaces tanto de autorrenovarse como de diferenciarse en todos los linajes hematopoyéticos. De esta forma, estas terapias génicas deben dirigirse a las células "correctas", es decir, los hemocitoblastos (HSC), sin modificar sus propiedades. La población de elección para dirigirse a las HSC está constituida por células progenitoras CD34<sup>+</sup>, que están particularmente enriquecidas en estos citoblastos. Sin embargo, las células CD34<sup>+</sup>, por ejemplo, representan solo un 0,001% de las células totales de la sangre. De acuerdo con esto, para evitar las etapas incómodas de la extracción celular, el cultivo en presencia de múltiples factores de crecimiento o adyuvantes de la transducción, y la infusión en el paciente, las partículas de vector tienen que mostrar una especificidad muy alta hacia las células CD34<sup>+</sup>, con el fin de permitir la transducción de las células CD34<sup>+</sup> en muestras corporales no purificadas, tales como muestras de sangre, o para asegurar una eficaz transducción *in vivo* de las células CD34<sup>+</sup> a pesar de la dilución de las partículas de vector.

20 **[0003]** De esta manera Sandrin y col. (2002) Blood 100: 823-832 han establecido que las partículas de vector derivadas del Virus de la inmunodeficiencia de Simios (VIS) que expresan una glicoproteína de la envoltura quimérica, RDTR, constituida por la fusión de los dominios transmembrana y extracelulares de la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 endógeno felino y el dominio citoplásmico de la glicoproteína de la envoltura A del virus de la leucemia murina. Dichas partículas de vector se dan a conocer también en el documento WO 03/91442. Cuando se utiliza un adyuvante de la transducción, tal como RetroNectin®, la velocidad de la transducción obtenida mediante las partículas de vector que presentan la proteína RDTR quimérica es aproximadamente la misma velocidad que la observada con las partículas de vector derivadas de VIS que expresan la glicoproteína de la envoltura G del Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV). Sin embargo, en ausencia de adyuvante de la transducción, las partículas del vector RDTR presentan una transducción mucho menor de las células CD34<sup>+</sup> aisladas que los vectores que presentan la glicoproteína VSV-G. A pesar de esto, no se ha mostrado una particular selectividad hacia las células CD34<sup>+</sup> que se encuentre asociada a RDTR, ya que las partículas del vector que expresan esta proteína quimérica transducen las células CD34<sup>+</sup> y los linfocitos de sangre periférica con aproximadamente la misma eficacia.

35 **[0004]** En otro intento de dirigirse a las células CD34<sup>+</sup>, Verhoeven y col. (2005) Blood 106: 3386-3395 han creado partículas de vector derivadas de VIH-1 que expresan la glicoproteína de la envoltura G de VSV y las citocinas denominadas de acción temprana, concretamente, la trombopoyetina (TPO) y el factor citoblástico (SCF). Los autores han mostrado de esta manera que estas partículas de vector proporcionaron una transducción eficaz de células CD34<sup>+</sup> aisladas. Sin embargo, no se podría evidenciar especificidad directora de estas partículas de vector.

40 **[0005]** De acuerdo con esto, es un objeto de la presente invención proporcionar partículas de vector que sean más eficaces que las de la técnica anterior para dirigirse específicamente a células CD34<sup>+</sup>.

**Resumen de la invención**

45 **[0006]** La presente invención surge del descubrimiento, realizado por los inventores, de que la expresión simultánea de RDTR y SCF en partículas de vector derivadas de VIH tenía efectos sinérgicos inesperados sobre la eficacia y la especificidad de la transducción de las células CD34<sup>+</sup>. De forma ventajosa, dichas partículas de vector que no son dependientes de RetroNectin® para conseguir la transducción pueden efectuar una eficaz transducción a una baja dosificación, y son capaces de transducir células CD34<sup>+</sup> en sangre completa reciente.

50 **[0007]** La presente invención se refiere más concretamente a una partícula de vector lentivírico para transferir uno o más ácidos nucleicos a células CD34<sup>+</sup>, en la que dicha partícula de vector comprende al menos:

- una primera proteína que comprende una fusión de los dominios transmembrana y extracelulares de la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 endógeno felino y el dominio citoplásmico de la glicoproteína de la envoltura A del virus de la leucemia murina, y

- una segunda proteína que comprende un ligando del receptor c-Kit, siendo dicho ligando del receptor c-Kit, la citocina del factor citoblástico (SCF).

en la que la partícula de vector no comprende la glicoproteína de la envoltura G del virus de la estomatitis vesicular (VSV).

5 **[0008]** La presente invención se refiere también al uso de (i) un primer ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una primera proteína tal como se ha definido anteriormente, y de (ii) un segundo ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una segunda proteína tal como se ha definido anteriormente, para preparar una partícula de vector lentivírico para transferir uno o más ácidos nucleicos a células CD34+.

10 **[0009]** La presente invención se refiere además a un medicamento que comprende una partícula de vector lentivírico tal como se ha definido anteriormente como ingrediente activo.

**[0010]** La presente invención se refiere también al uso de una partícula de vector lentivírico tal como se ha definido anteriormente, para transferir uno o más ácidos nucleicos a células CD34+ *ex vivo*.

15

**[0011]** La presente invención se refiere también a un procedimiento para preparar células CD34+ previsto para tratar un individuo, en el que las células CD34+ que se van a administrar al individuo se ponen en contacto *in vitro* con una partícula de vector lentivírico tal como se ha definido anteriormente;

20 en el que las células se transducen por uno o más ácidos nucleicos transferidos desde la partícula de vector lentivírico

**[0012]** Se describen también procedimientos para el tratamiento de un individuo que necesita un tratamiento génico, en el que una cantidad terapéuticamente eficaz de la partícula del vector de la invención se administra al individuo. En dicho procedimiento, en una primera etapa, las células que se van a administrar al individuo se ponen en contacto con una partícula de vector de la invención, y en una segunda etapa, las células se administran al individuo.

25 **[0013]** Se describe también una proteína representada por la SEQ ID NO: 4 y un ácido nucleico que la codifica.

### 30 **Breve descripción de las figuras**

#### **[0014]**

35 La **Figura 1** representa el porcentaje de células CD34<sup>+</sup> (eje vertical) transducidas por las partículas de vector derivado de VIH que codifican PFV que expresan solo RDTR, en presencia de TPO recombinante (10 ng/ml) o SCF recombinante (50 ng/ml), o las partículas de vector que expresan RDTR y TPOHA, o RDTR y SCFHA, en presencia (barras ampliamente sombreadas) o ausencia (barras estrechamente sombreadas) de RetroNectin®.

40 La **Figura 2** representa el porcentaje de células CD34<sup>+</sup> (eje vertical) transducidas por partículas de vector derivadas de VIH que codifican PFV que expresan solo RDTR, en presencia de TPO recombinante (10 ng/ml) de SCF recombinante (50 ng/ml) o partículas de vector que expresan RDTR y TPOHA, o RDTR y SCFHA, a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 (barras ampliamente sombreadas), 2 (barras blancas) o 0,2 (barras estrechamente sombreadas) tal como se determinó en células HeLa.

45 La **Figura 3** representa el porcentaje de células que expresan PFV (eje vertical) presentes en una población de PBMC aislada de sangre del cordón umbilical transducidas por partículas de vector derivadas de VIH que codifican PFV que expresan solo RDTR en presencia de SCF recombinante (50 ng/ml), RDTR y SCFHA, VSV-G solo en presencia de SCF recombinante (50 ng/ml) o VSV-G y SCFHA, en el que las células son células CD34<sup>+</sup> (barras estrechamente sombreadas) o células CD3<sup>+</sup> (barras ampliamente sombreadas).

50

La **Figura 4** representa el porcentaje (eje vertical) de células CD34<sup>+</sup> que expresan PFV o células CD3<sup>+</sup> presentes en sangre completa de cordón umbilical transducidas por partículas de vector derivadas de VIH que codifican PFV que expresan solo RDTR en presencia de SCF recombinante (50 ng/ml) (primera barra), RDTR y SCFHA (segunda barra), VSV-G solo y SCF recombinante (50 ng/ml) (tercera barra), o VSV-G y SCFHA (cuarta barra).

55

La **Figura 5** representa el análisis del clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS) de la transducción (PFV<sup>+</sup>) de células humanas totales en la médula ósea. Los tres histogramas muestran respectivamente los resultados obtenidos sobre tres ratones diferentes inyectados. Las células se clasificaron de acuerdo con la expresión de hCD45 (hCD45<sup>+</sup>, eje vertical) y la expresión de PFV<sup>+</sup>, eje horizontal).

La **Figura 6** representa el análisis mediante FACS de la transducción (PFV<sup>+</sup>) de progenitores tempranos (hCD34<sup>+</sup>), progenitores mieloides (hCD13<sup>+</sup>), monocitos (hCD14<sup>+</sup>) y células pre y pro B (hCD19<sup>+</sup>) en la médula ósea. El primer histograma muestra los resultados obtenidos con células clasificadas de acuerdo con la expresión de hCD34 (hCD34<sup>+</sup>, eje vertical) y la expresión de PFV (PFV<sup>+</sup> eje horizontal). El segundo histograma muestra los resultados obtenidos con células clasificadas de acuerdo con la expresión de hCD13 (hCD13<sup>+</sup>, eje vertical) y la expresión de PFV (eje horizontal). El tercer histograma muestra los resultados obtenidos con células clasificadas de acuerdo con la expresión de hCD14 (hCD14<sup>+</sup>, eje vertical) y la expresión de PFV (eje horizontal). El cuarto histograma muestra los resultados obtenidos con células clasificadas de acuerdo con la expresión de hCD19 (hCD19<sup>+</sup>, eje vertical) y la expresión de PFV (eje horizontal).

La **Figura 7** representa el análisis mediante FACS de la transducción (PFV<sup>+</sup>) de timocitos humanos en el timo. Las células se clasificaron de acuerdo con la expresión de hCD45 (hCD45<sup>+</sup>, eje vertical) y la expresión de PFV (PFV<sup>+</sup>, eje horizontal).

La **Figura 8** representa el análisis mediante FACS de la transducción (PFV<sup>+</sup>) de linfocitos B (hCD19<sup>+</sup>) y linfocitos T (hCD3<sup>+</sup>) en la sangre periférica. El primer histograma muestra los resultados obtenidos con células clasificadas de acuerdo con la expresión de hCD19 (hCD19<sup>+</sup>, eje vertical) y la expresión de PFV (PFV<sup>+</sup>, eje horizontal). El segundo histograma muestra los resultados obtenidos con células clasificadas de acuerdo con la expresión de hCD3 (hCD3<sup>+</sup>, eje vertical) y la expresión (eje horizontal).

La **Figura 9** representa el análisis mediante FACS de la transducción (PFV<sup>+</sup>) de esplenocitos humanos (hCD45<sup>+</sup>), linfocitos B (hCD19<sup>+</sup>) y linfocitos T (hCD3<sup>+</sup>) en el bazo. El primer histograma muestra los resultados obtenidos con células clasificadas de acuerdo con la expresión de hCD45 (hCD45<sup>+</sup>, eje vertical) y la expresión de PFV (PFV<sup>+</sup>, eje horizontal). El segundo histograma muestra los resultados obtenidos con células clasificadas de acuerdo con la expresión de hCD19 (hCD19<sup>+</sup>, eje vertical) y la expresión de PFV (eje horizontal). El tercer histograma muestra los resultados obtenidos con células clasificadas de acuerdo con la expresión de hCD3 (hCD3<sup>+</sup>, eje vertical) y la expresión de PFV (eje horizontal).

### 30 **Descripción detallada de la invención**

**[0015]** Tal como se pretende en el presente documento, "partícula de vector" denota cualquier partícula responsable de expresar la primera proteína y la segunda proteína en su superficie y para unirse de manera reversible a un material biológico. Para la invención, dicha partícula de vector es

**[0016]** una partícula de vector lentivírico, tal como una partícula de vector lentivírico seleccionada entre el grupo que consiste en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), por ejemplo, VIH-1 o VIH-2, y el virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS)

**[0017]** Las partículas de vector lentivírico son bien conocidas por la persona experta en la técnica y se describen de forma notable en Naldini y col. (2000) Adv. Virus Res. 55: 599-609 y Negre y col. (2002) Biochimie 84: 1161-1171. Normalmente, las partículas de vector lentivírico de acuerdo con la invención comprenden al menos los siguientes componentes: (i) un componente de envoltura que está constituido por una bicapa fosfolipídica asociada a las proteínas de la envoltura, en la que las proteínas de la envoltura comprenden al menos la primera y la segunda proteínas anteriormente definidas, rodeando dicha envoltura (ii) un componente del núcleo, constituido por la asociación de una proteína gag, rodeando dicho núcleo por sí mismo (iii) componentes del genoma, constituidos normalmente por ácidos ribonucleicos (ARN) y (iv) un componente de enzima (pol). El material biológico puede estar presente en el interior de la envoltura, en el interior del núcleo y/o en el interior de los componentes del genoma.

**[0018]** Las personas expertas en la técnica pueden preparar fácilmente partículas de vector lentivírico siguiendo, por ejemplo, las directrices generales proporcionadas por Sandrin y col. (2002) Blood 100: 823-832. De manera breve, las partículas de vector lentivírico pueden generarse expresando de forma simultánea los elementos empaquetados (es decir, los componentes del núcleo y de la enzima), el componente del genoma y el componente de la envoltura en una célula productora así denominada, por ejemplo, células 293T de riñón embrionario humano. Normalmente, se pueden emplear de tres a cuatro plásmidos, pero el número puede ser mayor dependiendo del grado al cual los componentes del vector lentivírico se dividen en unidades separadas.

**[0019]** Generalmente, un plásmido codifica los componentes lentivíricos del núcleo (gag) y enzimáticos (pol) de la partícula de vector. El origen de los genes gag y pol proporciona su nombre a la partícula del vector lentivírico. Por

ejemplo, la expresión “partícula de vector derivada de VIH-1” indica normalmente que los genes gag y pol de la partícula del vector son los de VIH-1. Este plásmido se denomina el plásmido empaquetado. Uno o varios plásmidos diferentes codifican las proteínas que forman parte de la envoltura. En el presente caso, estos plásmidos pueden codificar de forma notable la primera y la segunda proteína. Como resultara evidente para una persona experta en la técnica, el primer y el segundo ácido nucleico anteriormente definidos pueden ser tanto distintos como fusionados. Otro plásmido adicional codifica el genoma.

**[0020]** Tal como se pretende en el presente documento, la expresión “material biológico” se refiere a uno o más compuestos responsables de alterar la estructura y/o la función de una célula. Para la invención, el material biológico es uno o más ácidos nucleicos, que en el caso de las partículas de vector lentivírico, puede estar comprendido en el genoma de la partícula del vector. El genoma comprende normalmente el uno o más ácidos nucleicos, unidos preferiblemente a los elementos genéticos necesarios para su expresión en la célula diana, tales como promotores y terminadores, flanqueados por elementos que actúan en cis necesarios para la inclusión del genoma en el elemento del núcleo, su transcripción inversa en ácido desoxirribonucleico (ADN), la importación del genoma retrotranscrito en el núcleo de la célula diana y la integración del genoma retrotranscrito en el interior del genoma de la célula diana.

**[0021]** Las células receptoras del material biológico que se va a transferir, o células diana, son cualquier célula responsable de unirse mediante la partícula de vector anteriormente definida. Si la partícula del vector es una partícula de vector lentivírico, la célula diana se refiere a cualquier célula responsable de transducirse por la partícula de vector. Estas células expresan normalmente el receptor de c-Kit que se une al ligando de c-Kit de la primera proteína. Para la invención, las células son células CD34<sup>+</sup>, en particular, células CD34<sup>+</sup> humanas, y, más concretamente, hemocitoblastos (HSC), de forma notable HSC humanos.

**[0022]** Tal como se pretende en el presente documento “transferir” se refiere a la capacidad de la partícula de vector para liberar inicialmente el material biológico a la membrana o al citoplasma de la célula diana, tras unirse a la célula diana. Tras la liberación, el material biológico se puede translocar a otro compartimento de la célula.

**[0023]** Se describe de forma notable la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 endógeno de felino en Cosset y col. (1995) J. Virol. 69: 7430-7436. A modo de ejemplo, la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 corresponde al número de acceso del GenBank XB87829. La persona experta en la técnica puede identificar fácilmente porciones de RD114 que corresponden a los dominios transmembrana y extracelular

**[0024]** Tal como se pretende en el presente documento, la expresión “dominios transmembrana y extracelular de la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 endógeno” se refiere a los dominios transmembrana y extracelular de la glicoproteína de la envoltura de un virus RD114 endógeno felino natural o de cualquiera de sus mutantes derivados del anterior mediante delección, inserción o sustitución de uno o algunos aminoácidos, con la condición de que dicho mutante presente esencialmente las mismas propiedades que los dominios transmembrana y extracelular de la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 endógeno felino natural a partir del cual se deriva.

**[0025]** Tal como se pretende en el presente documento, se dirá que un mutante presentará esencialmente las mismas propiedades que los dominios transmembrana y extracelular de la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 endógeno felino natural a partir del cual se deriva si, cuando se sustituyen los dominios transmembrana y extracelular de la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 endógeno felino natural en una partícula del vector de referencia tal como se describe en el presente documento que transporta una primera proteína de la secuencia de SEQ ID NO: 2 y una segunda proteína de la secuencia de SEQ ID NO: 4, la partícula del vector que transporta el mutante presenta al menos un 30%, preferiblemente al menos un 50%, de forma más preferible al menos un 75%, de la transducción de células CD34<sup>+</sup> que se pueden observar con la partícula del vector de referencia. Preferiblemente, las condiciones de transducción son las que se muestran en el **Ejemplo 2**.

**[0026]** A modo de ejemplo, los dominios transmembrana y extracelular de la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 endógeno de felino se representan por la SEQ ID NO: 5.

**[0027]** Preferiblemente, la primera proteína comprende o consiste en una fusión de los dominios transmembrana y extracelular de la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 endógeno felino y del dominio citoplásmico de una glicoproteína de envoltura retroviral. En esta fusión se prefiere que el término C del dominio transmembrana de RD114 se fusione con el término N del dominio citoplásmico de una glicoproteína de envoltura retroviral.

**[0028]** De forma más preferible, la primera proteína comprende o consiste en una fusión de los dominios transmembrana y extracelular de la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 endógeno felino y del dominio

citoplásmico de la glicoproteína de la envoltura A de virus de la leucemia murina. En esta fusión se prefiere que el término C del dominio transmembrana de RD114 se fusione con el término N del dominio citoplásmico de la glicoproteína de la envoltura A del VLM.

- 5 **[0029]** La glicoproteína de la envoltura A del virus de la leucemia murina se describe de forma notable en Ott y col. (1990) J. Virol. 64: 757-766. Preferiblemente, la glicoproteína de la envoltura A del virus de la leucemia murina es la de la cepa 4070A. La persona experta en la técnica puede identificar fácilmente la porción de la glicoproteína de la envoltura A del virus de la leucemia murina que corresponde al dominio intracelular. A modo de ejemplo, el dominio intracelular de la glicoproteína de la envoltura A del virus de la leucemia murina se representa por la SEQ ID NO: 6.
- 10 **[0030]** Lo más preferible, la primera proteína se representa por la SEQ ID NO: 2 y está en concreto codificada por la SEQ ID NO: 1. Un plásmido preferido para expresar la primera proteína en una célula productora se representa por la SEQ ID NO: 11.
- 15 **[0031]** La persona experta en la técnica conoce bien el receptor de c-Kit. Este se describe de forma notable por Ashman (1999) Int. J. Biochem. Cell. Biol. 31: 1037-1051. A modo de ejemplo, el receptor de c-Kit humano está codificado por la SEQ ID NO: 8. De acuerdo con esto, está también dentro del alcance de la persona experta en la técnica identificar, designar o seleccionar ligandos del receptor de c-Kit.
- 20 **[0032]** El ligando natural del receptor de c-Kit es la citocina del factor citoblástico (SCF). La citocina del SCF se describe de forma notable en Ashman (1999) Int. J. Biochem. Cell. Biol. 31: 1037-1051. Como tal, en la partícula de vector anteriormente definida, el ligando del receptor de c-Kit es preferiblemente la citocina del SCF. Para la invención, se utiliza la citocina del SCF. Tal como se pretende en el presente documento, la expresión de la citocina de SCF se refiere a una citocina del SCF natural o a cualquier mutante de una citocina del SCF natural derivado de
- 25 dicha SCF natural por delección, inserción o sustitución de uno o varios aminoácidos, en el que dicho mutante retiene la capacidad de la citocina del SCF natural de unirse al receptor de c-Kit. Preferiblemente, la citocina del SCF es la citocina del SCF humano. A modo de ejemplo, la citocina del SCF humano corresponde al número de referencia del GenBank P21583. Se prefiere más que la citocina del SCF humano utilizada en el presente documento esté privada de su péptido señal y de su dominio transmembrana y citoplásmico (*es decir*, solo se utiliza el dominio extracelular
- 30 de la citocina del SCF), *por ejemplo*, tal como se representa por la SEQ ID NO: 9.
- [0033]** De forma más preferible, la segunda proteína de la partícula del vector anteriormente definida comprende o consiste en una fusión de la citocina del SCF e (i) el dominio N terminal de una glicoproteína hemaglutinina, o (ii) una glicoproteína de envoltura retrovítica. En esta fusión se prefiere que el término C del SCF se fusione con el término
- 35 N del dominio N terminal de la glicoproteína hemaglutinina o con el término N de la glicoproteína de envoltura retrovítica.
- [0034]** Preferiblemente, la glicoproteína hemaglutinina es la de un virus de la gripe, de forma más preferible, el virus de la gripe aviar.
- 40 **[0035]** Preferiblemente, el dominio del extremo N de la glicoproteína hemaglutinina comprende o consiste en los aminoácidos contiguos procedentes del extremo N de la glicoproteína al extremo C de la subunidad HA1.
- [0036]** Una persona experta en la técnica conoce bien la estructura de la subunidad de la glicoproteína hemaglutinina. La hemaglutinina del virus de la gripe aviar se describe de forma notable en Hatzioannou y col. (1998) J. Virol. 72: 5313-5317.
- 45 **[0037]** A modo de ejemplo, el dominio del extremo N de la hemaglutinina del virus de la gripe aviar está representado por la SEQ ID NO: 10.
- 50 **[0038]** Preferiblemente, en la segunda proteína, la glicoproteína de la envoltura retrovítica es la glicoproteína de la envoltura A del virus de la leucemia murina
- [0039]** Como será evidente para cualquier persona experta en la técnica, la segunda proteína puede comprender también, de forma preferible un péptido señal previsto para promover la translocación del retículo endoplásmico de la segunda proteína. En determinados casos, el péptido señal se puede escindir durante o después de la inserción en la membrana objetivo. La persona experta en la técnica conoce bien dichos péptidos señal y se pueden encontrar, por ejemplo, en las extremidades de las proteínas de membrana. A modo de ejemplo, el péptido señal puede ser el de la glicoproteína de la envoltura A del virus de la Leucemia Murina, que puede representarse

mediante la SEQ ID NO: 7.

**[0040]** De esta manera, la segunda proteína comprende o consiste preferiblemente en una fusión de la citocina del SCF, el dominio del extremo N de una glicoproteína hemaglutinina, y un péptido señal. En esta fusión se prefiere que el extremo C del péptido señal se fusione con el extremo N del SCF, y que el extremo C del SCF se fusione con el extremo N del dominio N terminal de la glicoproteína hemaglutinina.

**[0041]** Cuando la segunda proteína comprende o consiste en una fusión de SCF y una glicoproteína de la envoltura retroviral, se prefiere que el extremo C del SCF se fusione con el extremo N de la glicoproteína de la envoltura retroviral privada de su péptido señal, y que el extremo N del SCF se fusione con el extremo C de un péptido señal tal como se ha definido anteriormente, que es preferiblemente el péptido señal de la glicoproteína de la envoltura retroviral a la cual este se fusiona.

**[0042]** Lo más preferible, la segunda proteína está representada por la SEQ ID NO: 4 y está en concreto codificada por la SEQ ID NO: 3. Un plásmido preferido para expresar la primera proteína en una célula productora está representado por la SEQ ID NO: 12.

**[0043]** En una realización particular de la partícula de vector anteriormente definida, la primera proteína está representada por la SEQ ID NO: 2 y la segunda proteína está representada por la SEQ ID NO: 4.

**[0044]** En una realización descrita en el presente documento, la segunda proteína tal como se ha definido anteriormente se fusiona con la primera proteína tal como se ha definido anteriormente. Preferiblemente, cuando la primera y la segunda proteína se fusionan, la segunda proteína consiste en una citocina del SCF fusionada opcionalmente con un péptido señal, tal como se ha definido anteriormente. De forma más preferible, cuando la primera y la segunda proteína se fusionan, el extremo C de un péptido señal se fusiona con el extremo N de una citocina del SCF, el extremo C de la citocina del SCF se fusiona al extremo N del dominio extracelular de RD114, y el extremo C del dominio transmembrana de RD114 se fusiona con el extremo N del dominio citoplásmico de una glicoproteína de envoltura retroviral.

**[0045]** Se describen también la primera y la segunda proteínas fusionadas tal como se ha definido anteriormente y los ácidos nucleicos que comprenden las secuencias que las codifican.

**[0046]** Para la invención, la partícula de vector anteriormente definida no comprende la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV).

**[0047]** La glicoproteína de la envoltura V del VSV se describe de forma notable en Yee y col. (1994) *Methods Cell Biol.* 43: 99-112. A modo de ejemplo, la glicoproteína de la envoltura G del VSV está representada por la SEQ ID NO: 13.

**[0048]** Como será evidente a partir de lo anterior, la partícula de vector anteriormente definida se puede usar para transferir *in vivo* o *ex vivo* el material biológico a células, en particular, a células CD34<sup>+</sup>, y entre ellas a las HSC.

**[0049]** De acuerdo con esto, la partícula de vector está particularmente indicada para tratar enfermedades relacionadas con células hematopoyéticas tanto mediante la administración directa de la partícula del vector al individuo que padece dicha enfermedad, como administrando las células, en particular las células que se originan a partir del individuo que padece dicha enfermedad, que se ha puesto en contacto *ex vivo* con la partícula del vector.

**[0050]** Para la invención, la partícula del vector es una partícula de vector lentiviral tal como se ha definido anteriormente y las células diana se transducen por uno o más ácidos nucleicos, previstos para tratar la enfermedad.

**[0051]** La partícula del vector podría estar indicada de esta manera para tratar la mielosupresión y las neutropenias que pueden producirse como resultado de la quimioterapia, el tratamiento inmunosupresor, infecciones tales como SIDA, trastornos genéticos de células hematopoyéticas, cánceres y similares.

**[0052]** Los trastornos genéticos de células hematopoyéticas a modo de ejemplo que se contemplan incluye la anemia de células falciformes, las talasemias, hemoglobinopatías, trombostenia de Glanzmann, trastornos de almacenamiento lisosómico (tales como enfermedad de Fabry, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Niemann-Pick, y síndrome de Wiskott-Aldrich), síndromes de inmunodeficiencia combinada grave (SIDCG), así como enfermedades que son el resultado de la ausencia de una producción sistémica de una proteína secretada, por

ejemplo, el factor de coagulación VIII y/o IX.

**[0053]** En dichos casos, se podría desear transferir uno o más ácidos nucleicos tales como los genes de la globina, los factores de crecimiento hematopoyéticos, que incluirían la eritropoyetina (EPO), las interleucinas (especialmente interleucina-1, interleucina-2, interleucina-3, interleucina-6, interleucina-12, etc.) y los factores estimuladores de colonias (tales como el factor estimulador de colonias de granulocitos, factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos, o factor estimulador de colonias de citoblastos, la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta$  específica de plaquetas, genes de resistencia a antifúngicos, los genes gp91 o gp 47 que son defectivos en pacientes en enfermedad granulomatosa crónica (EGC), genes antivíricos que convierten las células en resistentes a infecciones por patógenos tales como el virus de la inmunodeficiencia humana, genes que codifican los factores VIII o IX de la coagulación de la sangre que están mutados en ligandos hemofílicos implicados en las respuestas inmunes mediadas por los linfocitos T tales como los receptores del antígeno de los linfocitos T, los receptores del antígeno de los linfocitos B (inmunoglobulinas), el receptor común y la cadena de la interleucina, una combinación de receptores de antígeno de los linfocitos T y los linfocitos B solos o en combinación con anticuerpos monocatenarios (ScFv), IL2, IL12, TNF, Interferón gammas, CTLA4, B7 y similares, genes expresados en células tumorales tales como Melana, genes MAGE (tales como MAGE-1, MAGE-3), P198, P1A, gp100, etc.

**[0054]** Los cánceres a modo de ejemplo son aquellos de origen hematopoyético, por ejemplo, que provienen de linajes mieloides, linfoides o eritroides, o las células precursoras de los mismos. Los trastornos mieloides a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, leucemia promieloide aguda ((LPMA), leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia mielógena crónica (LMC). Las neoplasias promieloides que pueden tratarse utilizando una partícula de vector tal como se ha definido anteriormente incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda (LLA) que incluye LLA de linaje B y LLA de linaje T, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia prolinfocítica (LPL), leucemia de células pilosas (LCP) y macroglobulinemia de Waldenstrom (MW). Las formas adicionales de linfomas malignos contempladas como candidatas para el tratamiento que utilizan las partículas de vector lentivírico de la presente invención incluyen, pero no se limitan a linfoma no de Hodgkin y sus variantes, linfomas de linfocitos T periféricos, leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos (LTA), linfoma cutáneo de linfocitos T (LCLT), Leucemia de linfocitos granulares grandes (LLGG) y enfermedad de Hodgkin.

**[0055]** Cuando la partícula de vector se utiliza como un medicamento y se administra a un individuo en un procedimiento terapéutico, se prefiere la administración a través de la ruta intravenosa o mediante la ruta medular, en particular, la ruta medular del fémur o del húmero. Para la administración intravenosa, se puede usar una dosis unitaria de aproximadamente  $5 \cdot 10^8$  a aproximadamente  $10^9$  partículas de vector, tal como se ha definido anteriormente.

**[0056]** Cuando se utiliza la partícula de vector *ex vivo*, la partícula de vector se puede poner en contacto, preferiblemente *in vitro*, tanto con células aisladas como purificadas, tales como células CD34<sup>+</sup> (Como es el caso de la invención), o con muestras corporales no purificadas.

**[0057]** Las células se pueden aislar o purificar de diversos tejidos, en particular, tomarse del individuo, tal como de la sangre, en particular de la sangre del cordón umbilical, o de la médula ósea.

**[0058]** Las muestras corporales no purificadas pueden originarse a partir del individuo que se va a tratar, y comprenden de forma notable muestras de sangre, en particular muestras de sangre completa del cordón umbilical.

**[0059]** La cantidad de partícula de vector que se va a usar para las transferencias *ex vivo* del material biológico es, por ejemplo, de aproximadamente  $10^7$  a aproximadamente  $5 \cdot 10^7$  de glóbulos blancos totales (en los que las células que se van a transducir están comprendidas en los glóbulos blancos totales de una muestra de sangre completa).

## 50 EJEMPLOS

### Ejemplo 1

#### Producción de partículas de vector lentivírico (VL)

**[0060]** Los inventores expresaron dos citocinas de acción temprana, una trombopoyetina (TPO) y un factor citoblástico (SCF), sobre la superficie de una partícula de vector lentivírico (LV).

**[0061]** Una forma truncada de TPO de 171 aminoácidos de longitud, que muestra tener una actividad biológica 3

veces mayor que la TPO natural, se fusionó con el extremo N de la glicoproteína de la hemaglutinina de la gripe (HA) para formar TPOHA. La segunda citocina, SCF, se fusionó también con el extremo N de la glicoproteína HA para formar SCFHA (SEQ ID NO: 4) que se incorpora eficazmente e LV.

5 **[0062]** Debido a que estas glicoproteínas HA quiméricas demostraron una reducida infectividad, se expresó simultáneamente una fusión adicional de la glicoproteína competente. Se escogió la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 endógeno felino quimérico, en el que se intercambiaron la cola citoplásmica de RD114 por la de la glicoproteína de la envoltura A del virus de la leucemia murina (VLM-A) que dio como resultado un RDTR mutante (SEQ ID NO: 2), que permite una elevada incorporación en el VIH tan bien como las partículas del VIS (Sandrin y col. (2002) Blood 100: 823-832).

**[0063]** De esta manera, se optimizó un protocolo de transfección para expresar de forma simultánea SCFHA o TPOHA con RDTR sobre partículas de vector lentivírico derivadas de VIH.

15 **[0064]** De manera breve, se sembraron  $2,5 \times 10^6$  células 293T el día antes de la transfección en placas de 10 cm en un volumen final de 10 ml de DMEM. Al día siguiente, estas células se transfectaron de manera simultánea con una construcción gag-pol derivada de VIH o VIS (8,6  $\mu$ g) con la partícula del vector de transferencia del gen lentivírico (8,6  $\mu$ g) y construcciones que codificaban dos glicoproteínas procedentes de: a) VSV-G (1,5  $\mu$ g) (SEQ ID NO: 14) o RDTR (SEQ ID NO: 11) (7  $\mu$ g) y b) TPOHA (SEQ ID NO: 15) o c) SCFHA (SEQ ID NO: 12) (1,5  $\mu$ g),  
20 utilizando el sistema de transfección de calcio-fosfato de Clontech. 4  $\mu$ g de un plásmido que codificaba una neuraminidasa se transfectaron simultáneamente para permitir una liberación eficaz de la partícula de vector procedente de la célula productora debido a que la envoltura de HA (SCFHA y TPOHA) une de otra forma las partículas del vector con las células productoras debido a la expresión del ácido siálico por las células 293T productoras. 15 h después de la transfección, se sustituyó el medio por 6 ml de medio CellGro® reciente (CellGenix)  
25 y 36 h después de la transfección, se recogieron las partículas del vector, se filtraron a través de una membrana dimensionada con poros de 0,45  $\mu$ m y se almacenaron a  $-80^\circ$  C. Las partículas de vector se pueden concentrar adicionalmente mediante ultracentrifugación o concentración mediada por polietilenglicol a una baja velocidad de centrifugación.

30 **[0065]** Se obtuvieron de esta manera títulos de  $5 \times 10^5$ - $10^6$  UI/ml, que fueron comparables a las partículas de vector pseudotipadas individualmente de RDTR.

**[0066]** La expresión simultánea funcional de TPO en partículas de vector que expresaban de forma simultánea TPOHA/RTDR se demostró en células BaF3-Mpl, que son dependientes de TPO para la supervivencia y el  
35 crecimiento, esencialmente tal como se describe por Geddis y col. (2001) J. Biol. Chem. 276: 34473-34479. De forma similar, la expresión simultánea de SCF en partículas del vector SCFHA/RTDR debido a la supervivencia sostenida de células BAF3-cKit, que dependen de SCF para la supervivencia (Bayle y col. (2004) J Biol Chem. 279: 12249-12259), incluso a una baja multiplicidad de infección (M.O.I.)

## 40 **Ejemplo 2**

### **Transducción de células CD34<sup>+</sup> aisladas**

**[0067]** Las partículas de vector se ensayaron en primer lugar sobre la transducción de células CD34<sup>+</sup> aisladas de  
45 sangre de cordón umbilical humano (CB). Las células CD34<sup>+</sup> de CB son células hematopoyéticas muy inmaduras que contienen hemocitoblastos.

**[0068]** De manera breve, se aislaron células CD34<sup>+</sup> mediante selección positiva utilizando perlas dirigidas contra CD34<sup>+</sup> (Miltenyi Biotech) procedentes de sangre del cordón umbilical y se cultivaron sobre placas no revestidas o  
50 revestidas de RetroNectin® (Takara). Posteriormente, se incubaron las células con proteína fluorescente verde (PFV) que codificaba partículas de vector derivadas de VIH que expresaban RDTR, en presencia de citocinas recombinantes humanas (TPO = 10 ng/ml; SCF = 50 ng/ml) (Preprotech, Rocky Hill, EE.UU.), o que expresaban simultáneamente RDTR y TPOHA o RDTR y SCFHA, a una multiplicidad de infección (M.O.I) de 10, esencialmente tal como se ha descrito por Verhoeven y col. (2005) Blood 106: 3386-3395.

55 **[0069]** Tal como se muestra en la Figura 1, las partículas de vector derivadas de VIH pseudotipadas con RDTR/SCFHA resultantes fueron mucho más eficaces en la transducción de células CD34<sup>+</sup> derivadas de sangre del cordón umbilical, que las derivadas de LV pseudotipadas con RDTR y TPOHA, o solo con RDTR en presencia de las citocinas correspondientes en su forma soluble. Además, en contraste con las partículas de vector derivadas de VIH

pseudotipadas con RDTR/SCFHA, las partículas de vector pseudotipadas solo con RDTR son completamente dependientes de RetroNectin® para la transducción de células CD34<sup>+</sup> (RetroNectin® es un péptido quimérico de fibronectina humana producido en *Escherichia coli* que se piensa que se une a las partículas del vector y a las células diana).

5

**[0070]** De esta manera, los anteriores resultados indican que está teniendo lugar un mecanismo sinérgico inesperado entre RDTR, que permite la fusión entre las partículas de vector y la célula, y SCFHA, permitiendo la unión y la estimulación específicas de las células c-Kit<sup>+</sup> / CD34<sup>+</sup>, lo que da como resultado la elevada eficacia de transducción deseada.

10

### **Ejemplo 3**

#### **Multiplicidad de infección para las células CD34<sup>+</sup>**

15 **[0071]** Una importante característica para el uso *in vivo* de las partículas de vector de la invención es que deben permitir la elevada eficacia de transducción en células CD34<sup>+</sup> incluso a una dosificación de partículas de vector muy baja, ya que una administración sistémica de una partícula de vector terapéutica daría como resultado una importante dilución de la concentración de la partícula de vector. De esta manera, los inventores ensayaron la dosificación eficaz mínima de las partículas de vector de acuerdo con la invención.

20

**[0072]** De manera breve, se aislaron células CD34<sup>+</sup> mediante selección positiva utilizando perlas dirigidas contra CD34<sup>+</sup> (Miltenyl Biotech) procedentes de sangre del cordón umbilical y se cultivaron sobre placas de cultivo no revestidas (es decir, en ausencia de RetroNectin®). Posteriormente, se incubaron las células con proteína fluorescente verde (PFV) que codificaba partículas de vector derivadas de VIH que expresaban RDTR, en presencia de citocinas recombinantes humanas (TPO = 10 ng/ml; SCF = 50 ng/ml), o que expresaban de forma simultánea RDTR y TPOHA o RDTR y SCFHA a una M.O.I. de 10,2 o de 0,2, esencialmente, tal como se describe en Verhoeyen y col. (2005) Blood 106: 3386-3395. En el día 3 tras el inicio de la transducción, se evaluaron las células para la expresión de la PFV mediante un clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS).

25

30 **[0073]** Tal como se muestra en la **Figura 2**, la partícula de vector RDTR/SCFHA de la invención permitió una reducción de la dosificación de la partícula del vector a una M.O.I. de 0,2, sin observar una disminución significativa en la eficacia de la transducción de las células CD34<sup>+</sup>. De esta manera, una disminución de 50 veces en la dosificación de la partícula del vector RDTR/SCFHA dio como resultado un promedio en la reducción de 1,4 veces de la transducción de células CD34<sup>+</sup>. En contraste, la partícula del vector de RDTR/TPOHA dio como resultado una transducción de CD34<sup>+</sup> significativamente menor cuando se utilizó una M.O.I de 0,2.

35

### **Ejemplo 4**

#### **Transducción de RDTR/SCFHA diana con células CD34<sup>+</sup> en una población de células de la sangre mononucleares periféricas.**

40

**[0074]** Una partícula de vector prevista para el tratamiento génico *in vivo* necesita de forma notable ser muy discriminativa entre células diana y no diana. De esta manera, después de haber demostrado la capacidad de la partícula de vector de acuerdo con la invención de transducir células CD34<sup>+</sup> aisladas, se evaluó su selectividad añadiendo la partícula de vector a una población de células mononucleares de sangre periférica completa (PBMC) a una M.O.I. baja. A este respecto, es importante resaltar que dicha población no contenía más de un 1% de células CD34<sup>+</sup>.

45

**[0075]** De manera breve, se aislaron PBMC procedentes de sangre de cordón umbilical reciente mediante un gradiente de ficol, tal como conoce bien la persona experta en la técnica, y se cultivaron en ausencia de RetroNectin®. Se llevó a cabo la transducción de PBMC con proteína fluorescente verde (PFV) que codificaba partículas de vector derivadas de VIH que expresaban RDTR o VSV-G en presencia de rSCF humano (50 ng/ml) o que expresaban de manera simultánea RDTR y SCFHA o VSV-G y SCFHA, sin añadir citocinas exógenas, a una M.O.I. de 0,2, esencialmente tal como se ha descrito por Verhoeyen y col. (2005) Blood 106: 3386-3395. En el día 3 tras el inicio de la transducción, las células CD34<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup> se evaluaron para la expresión de la PFV mediante el clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS).

50

55

**[0076]** Tal como se muestra en la **Figura 3**, las partículas del vector RDTR/SCFHA fueron capaces de dirigirse preferentemente y transducir células CD34<sup>+</sup> diana (hasta un 19%), en marcado contraste con la partícula de vector

pseudotipada solo con RDTR, en presencia de SCF soluble, que no proporcionó nada de transducción, o a la partícula del vector VSV-G/SCFHA que proporcionó un nivel de traducción de las células CD34<sup>+</sup> de a lo sumo un 5%. De manera importante, la partícula del vector RDTR/SCFHA permitió transducir células CD34<sup>+</sup> en la población de PBMC a un nivel equivalente al obtenido para la transducción de células CD34<sup>+</sup> aisladas (comparar las **Figuras 2 y 3**). Además, la población de linfocitos T, que representa hasta un 80% de la población de PBMC completa, se tradujo muy mal mediante la partícula del vector RDTR/SCFHA (**Figura 3**). Merece la pena observar que otros linajes celulares presentes en la población de PBMC, tales como monocitos, linfocitos B y células NK no se transdujeron en modo alguno.

## 10 **Ejemplo 5**

### **Transducción de RDTR/SCFHA con células CD34<sup>+</sup> en condiciones similares a *in vivo***

**[0077]** Los inventores concibieron a continuación condiciones tan cercanas como fue posible a escenarios *in vivo* para dirigir la transferencia génica hacia células CD34<sup>+</sup>. De esta manera, los inventores llevaron a cabo la transducción de sangre de cordón umbilical total reciente, que contiene células procedentes de todos los linajes hematopoyéticos: progenitores tempranos, que incluyen hemocitoblastos (HSC), linfocitos, monocitos, y eritrocitos. Esto permite, (i) la evaluación de la transferencia génica dirigida a la población de células CD34<sup>+</sup>, que representan solo el 0,001% de células en sangre completa, y (ii) exposición de la partícula del vector a un sistema de complemento humano activo, un obstáculo encontrado por las partículas del vector vírico *in vivo*.

**[0078]** De esta manera, se incubó sangre de cordón umbilical total reciente (0,5 ml) con partículas de vector derivadas de VIH que codificaban PFV pseudotipadas solo con RDTR o solo con VSV-G, en presencia de SCF soluble (50 ng/ml), o que expresaban de forma simultánea RDTR y SCHFA o VSV-G y SCFHA, sin añadir citocinas exógenas, a una M.O.I. de 0,01 (calculada para la cantidad total de glóbulos blancos y rojos presentes en la muestra de sangre). Tras 6-8 h de incubación con las partículas de vector, se separaron de las PBMC de la sangre mediante un gradiente de ficol.

**[0079]** Posteriormente, las células CD34<sup>+</sup> se aislaron mediante selección positiva utilizando perlas dirigidas contra CD34<sup>+</sup> (Miltenyl Biotech) y se cultivaron adicionalmente en medio exento de suero en presencia de SCF humano recombinante soluble a fin de mantener la supervivencia hasta el análisis FACS.

**[0080]** A fin de desvelar posibles transferencias génicas sin diana, tras la eliminación de las células CD34<sup>+</sup>, las PBMC residuales que consisten principalmente en linfocitos T se cultivaron en medio RPMI suplementado con anticuerpos dirigidos contra CD3 y anticuerpos dirigidos contra CD-28 (BD Pharmingen, Le Pont de Claix, Francia) e IL-2 humana recombinante (Preprotech Rocky Hill, EE.UU.). Esto se llevó a cabo con un doble propósito: (i) activar los linfocitos T a fin de permitir la transducción, debido a que la mayoría de linfocitos T en la sangre están en estado quiescente y, de acuerdo con esto, no permiten la transducción lentivírica, y (ii) mantener la supervivencia de estas células hasta el análisis. Merece la pena observar que se utilizaron condiciones muy restrictivas para desvelar la transferencia génica en linfocitos T sin diana, que es probable que nunca se cumplan en las condiciones *in vivo*. En otras palabras, los escenarios experimentales utilizados con más probabilidad sobreestiman la transducción génica no específica *in vivo* de linfocitos. En el día 4 tras el inicio de la transducción, se evaluaron las células CD34<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup> para la expresión de la PFV mediante el clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS).

**[0081]** Tal como se muestra en la **Figura 4**, la partícula de vector RDTR/SCFHA permitió una transducción de 4,5% células CD34<sup>+</sup> frente a un 0,4% para la partícula del vector VSV-G/SCFHA, mientras que la transducción con partículas de vector que expresan solo VSV-G o solo RDTR es despreciable. De esta manera, la partícula de vector RDTR/SCFHA es 10 veces más eficaz que la partícula de vector VSV-G/SCFHA para transducir células CD34<sup>+</sup>. Además, la partícula del vector VSV-G/SCFHA transdujo fácilmente la población de linfocitos T sin diana, dando como resultado una selectividad de solo 1,8 veces para la transducción de células CD34<sup>+</sup> en comparación con los linfocitos T. En contraste, la partícula del vector RDTR demostró una selectividad de hasta 95 veces para las células CD34<sup>+</sup> en comparación con los linfocitos T. De esta manera, sabiendo que solo un 0,01% de células de la sangre transducidas inicialmente son células CD34<sup>+</sup> y que los linfocitos T representan el 1% de las células de la sangre, las partículas del vector RDTR/SCFHA dirigen eficazmente la transducción con células CD34<sup>+</sup>.

**[0082]** Con respecto a la baja eficacia de transducción conseguida con las partículas del vector VSV-G/SCFHA, esto puede ser debido a la susceptibilidad del vector hacia el complemento humano que, como consecuencia, podría afectar negativamente su uso *in vivo*.

**Ejemplo 6****Los RDTR/SCFHA que expresan los LV permiten la transferencia génica en células hCD34<sup>+</sup> in vivo**

5 **[0083]** Los inventores evaluaron la transferencia génica dirigida hacia las HSC realizadas por las partículas del vector RDTR/SCFHA *in vivo* en un modelo de murino humanizado.

10 **[0084]** De manera breve, se consiguió la reconstitución completa y funcional de todos los linajes hematopoyéticos humanos incluyendo los linfocitos B y T en crías de ratones Balbc Rag2<sup>-/-</sup>;  $\gamma$ c<sup>-/-</sup> mediante la inyección de sangre de células CD34<sup>+</sup> de cordón umbilical humano (UCB). Tras 13 semanas de reconstitución, los inventores detectaron un 35% en promedio de células humanas (hCD45<sup>+</sup>) en la médula ósea de estos ratones (**Figura 5**) de los cuales del 5 al 15% expresaron hCD34.

15 **[0085]** Partículas del vector RDTR/SCFHA que codificaban GFP se concentraron mediante centrifugación a baja velocidad sobre una columna de filtración para obtener títulos de hasta  $5 \times 10^8$  UI/ml.  $1 \times 10^5$  unidades infecciosas de las partículas del vector RDTR/SCFHA se inyectaron en la médula ósea del fémur de ratones humanizados de 13 semanas de edad

20 **[0086]** Una semana después de la inyección, se llevó a cabo el marcado con tres colores para medir la expresión de la PFV en los diferentes linajes hematopoyéticos así como en las células hCD34<sup>+</sup> diana en la médula ósea.

25 **[0087]** En la médula ósea lavada los inventores detectaron una transducción de hasta un 3% de las células humanas totales que habían colonizado la médula de los ratones (**Figura 5**). Teniendo en cuenta que un fémur contiene  $1,5 \cdot 10^7$  células, los inventores administraron una dosis muy baja del vector (MOI = 0,006). Sin embargo, se detectó una transducción selectiva de hasta un 3% de progenitores humanos tempranos (células hCD34<sup>+</sup>) y de un 3% de progenitores mieloides (hCD13<sup>+</sup>) en la MO (**Figura 6**). En contraste, los monocitos y los linfocitos B pre y pro se transdujeron en una baja extensión (hCD14 = 0%, hCD19 = 0,2%). Estos resultados deben explicarse por el hecho de que una semana después de la inyección, la diferenciación de las células hCD34<sup>+</sup>, incluyendo células hCD34<sup>+</sup> transducidas, en progenitores tempranos, tales como progenitores mieloides de hCD13<sup>+</sup> y linfocitos B pre y pro pueden haber sucedido ya.

35 **[0088]** De suma importancia, los inventores verificaron el escape de vectores *in vivo* analizando la transducción de los otros tejidos hematopoyéticos. No detectaron timocitos PFV<sup>+</sup> humanos (**Figura 7**), ni la transducción de linfocitos B CD19<sup>+</sup> humanos y linfocitos T CD3<sup>+</sup> en el torrente sanguíneo de estos ratones inyectados intrafemuralmente (**Figura 8**). Adicionalmente, no detectaron niveles significativos de linfocitos B transducidos (células hCD19<sup>+</sup>) y linfocitos T transducidos en el bazo (**Figura 9**).

40 **[0089]** Resumiendo, la administración local de dosis bajas de LV derivados de RDTR/SCFHA en la MO de ratones humanizados dio como resultado una transducción selectiva de células hCD34<sup>+</sup> *in vivo*.

**Tabla de referencia de identificadores de secuencias**

SEQ ID NO:	Características
1	Ácido nucleico que codifica una fusión de los dominios transmembrana y extracelular de la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 endógeno felino y el dominio citoplásmico de la glicoproteína de la envoltura A del VLM
2	Fusión de los dominios transmembrana y extracelular de la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 endógeno felino y el dominio citoplásmico de la glicoproteína de la envoltura A del VLM
3	Ácido nucleico que codifica una fusión de la citocina del SCF, el dominio N terminal de la glicoproteína hemaglutinina de un virus de la gripe
4	Fusión de la citocina SCF, el dominio del extremo de la glicoproteína hemaglutinina de un virus de la gripe y un péptido señal
5	Dominios transmembrana y extracelular del virus RD114 endógeno felino
6	Dominio citoplásmico de la glicoproteína A del Virus de la Leucemia Murina
7	Péptido señal de la glicoproteína de la envoltura A del Virus de la Leucemia Murina
8	Receptor de c-Kit humano
9	Citocina del SCF humana
10	Dominio del extremo N de la hemaglutinina del Virus de la gripe aviar
11	Plásmido que codifica la proteína de fusión de la SEQ ID NO: 2
12	Plásmido que codifica la proteína de fusión de la SEQ ID NO: 4
13	Glicoproteína de la envoltura G de VSV
14	Plásmido que codifica VSV-G
15	Plásmido que codifica TPOHA

LISTADO DE SECUENCIAS

5 [0090]

<110> INSERM

<120> Partículas de vector para dirigirse a células CD34+

10

<130> BET 08P0498

<150> EP 07290918.7

15 <151> 23-07-2007

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.4

20

<210> 1

<211> 1692

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Fusión de los dominios transmembrana y extracelular de la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 endógeno felino y el dominio citoplásmico de la envoltura A del VLM

30 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1692)

<400> 1

35

ES 2 426 089 T3

atg	aaa	ctc	cca	aca	gga	atg	gtc	att	tta	tgt	agc	cta	ata	ata	gtt	48
Met	Lys	Leu	Pro	Thr	Gly	Met	Val	Ile	Leu	Cys	Ser	Leu	Ile	Ile	Val	
1				5					10					15		
cgg	gca	ggg	ttt	gac	gac	ccc	cgc	aag	gct	atc	gca	tta	gta	caa	aaa	96
Arg	Ala	Gly	Phe	Asp	Asp	Pro	Arg	Lys	Ala	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Lys	
			20					25					30			
caa	cat	ggt	aaa	cca	tgc	gaa	tgc	agc	gga	ggg	cag	gta	tcc	gag	gcc	144
Gln	His	Gly	Lys	Pro	Cys	Glu	Cys	Ser	Gly	Gly	Gln	Val	Ser	Glu	Ala	
		35					40					45				
cca	ccg	aac	tcc	atc	caa	cag	gta	act	tgc	cca	ggc	aag	acg	gcc	tac	192
Pro	Pro	Asn	Ser	Ile	Gln	Gln	Val	Thr	Cys	Pro	Gly	Lys	Thr	Ala	Tyr	
	50					55					60					
tta	atg	acc	aac	caa	aaa	tgg	aaa	tgc	aga	gtc	act	cca	aaa	atc	tca	240
Leu	Met	Thr	Asn	Gln	Lys	Trp	Lys	Cys	Arg	Val	Thr	Pro	Lys	Ile	Ser	
65				70						75				80		
cct	agc	ggg	gga	gaa	ctc	cag	aac	tgc	ccc	tgt	aac	act	ttc	cag	gac	288
Pro	Ser	Gly	Gly	Glu	Leu	Gln	Asn	Cys	Pro	Cys	Asn	Thr	Phe	Gln	Asp	
				85					90					95		
tcg	atg	cac	agt	tct	tgt	tat	act	gaa	tac	cgg	caa	tgc	agg	cga	att	336
Ser	Met	His	Ser	Ser	Cys	Tyr	Thr	Glu	Tyr	Arg	Gln	Cys	Arg	Arg	Ile	
			100					105					110			
aat	aag	aca	tac	tac	acg	gcc	acc	ttg	ctt	aaa	ata	cgg	tct	ggg	agc	384
Asn	Lys	Thr	Tyr	Tyr	Thr	Ala	Thr	Leu	Leu	Lys	Ile	Arg	Ser	Gly	Ser	

ES 2 426 089 T3

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

ES 2 426 089 T3

gat	cat	tat	ata	cat	aga	cct	aaa	cga	gct	gta	cag	ttc	atc	cct	tta	1152
Asp	His	Tyr	Ile	His	Arg	Pro	Lys	Arg	Ala	Val	Gln	Phe	Ile	Pro	Leu	
	370					375					380					
cta	gct	gga	ctg	gga	atc	acc	gca	gca	ttc	acc	acc	gga	gct	aca	ggc	1200
Leu	Ala	Gly	Leu	Gly	Ile	Thr	Ala	Ala	Phe	Thr	Thr	Gly	Ala	Thr	Gly	
	385				390					395					400	
cta	ggt	gtc	tcc	gtc	acc	cag	tat	aca	aaa	tta	tcc	cat	cag	tta	ata	1248
Leu	Gly	Val	Ser	Val	Thr	Gln	Tyr	Thr	Lys	Leu	Ser	His	Gln	Leu	Ile	
				405					410					415		
tct	gat	gtc	caa	gtc	tta	tcc	ggt	acc	ata	caa	gat	tta	caa	gac	cag	1296
Ser	Asp	Val	Gln	Val	Leu	Ser	Gly	Thr	Ile	Gln	Asp	Leu	Gln	Asp	Gln	
			420					425						430		
gta	gac	tcg	tta	gct	gaa	gta	gtt	ctc	caa	aat	agg	agg	gga	ctg	gac	1344
Val	Asp	Ser	Leu	Ala	Glu	Val	Val	Leu	Gln	Asn	Arg	Arg	Gly	Leu	Asp	
		435					440					445				
cta	cta	acg	gca	gaa	caa	gga	gga	att	tgt	tta	gcc	tta	caa	gaa	aaa	1392
Leu	Leu	Thr	Ala	Glu	Gln	Gly	Gly	Ile	Cys	Leu	Ala	Leu	Gln	Glu	Lys	
	450					455					460					
tgc	tgt	ttt	tat	gct	aac	aag	tca	gga	att	gtg	aga	aac	aaa	ata	aga	1440
Cys	Cys	Phe	Tyr	Ala	Asn	Lys	Ser	Gly	Ile	Val	Arg	Asn	Lys	Ile	Arg	
465					470					475					480	
acc	cta	caa	gaa	gaa	tta	caa	aaa	cgc	agg	gaa	agc	ctg	gca	tcc	aac	1488
Thr	Leu	Gln	Glu	Glu	Leu	Gln	Lys	Arg	Arg	Glu	Ser	Leu	Ala	Ser	Asn	
			485					490						495		
cct	ctc	tgg	acc	ggg	ctg	cag	ggc	ttt	ctt	ccg	tac	ctc	cta	cct	ctc	1536
Pro	Leu	Trp	Thr	Gly	Leu	Gln	Gly	Phe	Leu	Pro	Tyr	Leu	Leu	Pro	Leu	
			500					505					510			
ctg	gga	ccc	cta	ctc	acc	ctc	cta	ctc	ata	cta	acc	att	ggg	cca	tgc	1584
Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Thr	Ile	Gly	Pro	Cys	
		515						520				525				
gtt	ttc	aat	cga	tta	gtt	caa	ttt	gtt	aaa	gac	agg	atc	tca	gta	gtc	1632
Val	Phe	Asn	Arg	Leu	Val	Gln	Phe	Val	Lys	Asp	Arg	Ile	Ser	Val	Val	
	530					535				540						
cag	gct	tta	gtc	ctg	act	caa	caa	tac	cac	cag	cta	aaa	cca	cta	gaa	1680
Gln	Ala	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Gln	Tyr	His	Gln	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	
545					550					555					560	
tac	gag	ccg	tga													1692
Tyr	Glu	Pro														

<210> 2  
<211> 563

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Fusión de los dominios transmembrana y extracelular de la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 endógeno felino y el dominio citoplásmico de la glicoproteína de la envoltura A del VLM

<400> 2

ES 2 426 089 T3

Met Lys Leu Pro Thr Gly Met Val Ile Leu Cys Ser Leu Ile Ile Val  
1 5 10 15

Arg Ala Gly Phe Asp Asp Pro Arg Lys Ala Ile Ala Leu Val Gln Lys  
20 25 30

Gln His Gly Lys Pro Cys Glu Cys Ser Gly Gly Gln Val Ser Glu Ala  
35 40 45

Pro Pro Asn Ser Ile Gln Gln Val Thr Cys Pro Gly Lys Thr Ala Tyr  
50 55 60

Leu Met Thr Asn Gln Lys Trp Lys Cys Arg Val Thr Pro Lys Ile Ser  
65 70 75 80

Pro Ser Gly Gly Glu Leu Gln Asn Cys Pro Cys Asn Thr Phe Gln Asp  
85 90 95

Ser Met His Ser Ser Cys Tyr Thr Glu Tyr Arg Gln Cys Arg Arg Ile  
100 105 110

Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Ser  
115 120 125

Leu Asn Glu Val Gln Ile Leu Gln Asn Pro Asn Gln Leu Leu Gln Ser  
130 135 140

Pro Cys Arg Gly Ser Ile Asn Gln Pro Val Cys Trp Ser Ala Thr Ala  
145 150 155 160

Pro Ile His Ile Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu Asp Thr Lys Arg Val  
165 170 175

Trp Thr Val Gln Lys Arg Leu Glu Gln Ile His Lys Ala Met Thr Pro  
180 185 190

Glu Leu Gln Tyr His Pro Leu Ala Leu Pro Lys Val Arg Asp Asp Leu  
195 200 205

Ser Leu Asp Ala Arg Thr Phe Asp Ile Leu Asn Thr Thr Phe Arg Leu  
210 215 220

ES 2 426 089 T3

Leu Gln Met Ser Asn Phe Ser Leu Ala Gln Asp Cys Trp Leu Cys Leu  
 225 230 235 240

Lys Leu Gly Thr Pro Thr Pro Leu Ala Ile Pro Thr Pro Ser Leu Thr  
 245 250 255

Tyr Ser Leu Ala Asp Ser Leu Ala Asn Ala Ser Cys Gln Ile Ile Pro  
 260 265 270

Pro Leu Leu Val Gln Pro Met Gln Phe Ser Asn Ser Ser Cys Leu Ser  
 275 280 285

Ser Pro Phe Ile Asn Asp Thr Glu Gln Ile Asp Leu Gly Ala Val Thr  
 290 295 300

Phe Thr Asn Cys Thr Ser Val Ala Asn Val Ser Ser Pro Leu Cys Ala  
 305 310 315 320

Leu Asn Gly Ser Val Phe Leu Cys Gly Asn Asn Met Ala Tyr Thr Tyr  
 325 330 335

Leu Pro Gln Asn Trp Thr Arg Leu Cys Val Gln Ala Ser Leu Leu Pro  
 340 345 350

Asp Ile Asp Ile Asn Pro Gly Asp Glu Pro Val Pro Ile Pro Ala Ile  
 355 360 365

Asp His Tyr Ile His Arg Pro Lys Arg Ala Val Gln Phe Ile Pro Leu  
 370 375 380

Leu Ala Gly Leu Gly Ile Thr Ala Ala Phe Thr Thr Gly Ala Thr Gly  
 385 390 395 400

Leu Gly Val Ser Val Thr Gln Tyr Thr Lys Leu Ser His Gln Leu Ile  
 405 410 415

Ser Asp Val Gln Val Leu Ser Gly Thr Ile Gln Asp Leu Gln Asp Gln  
 420 425 430

Val Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp  
 435 440 445

Leu Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile Cys Leu Ala Leu Gln Glu Lys  
 450 455 460

Cys Cys Phe Tyr Ala Asn Lys Ser Gly Ile Val Arg Asn Lys Ile Arg



ES 2 426 089 T3

atg	gcg	cgt	tca	acg	ctc	tca	aaa	ccc	ctt	aaa	aat	aag	gtt	aac	ccg	48
Met	Ala	Arg	Ser	Thr	Leu	Ser	Lys	Pro	Leu	Lys	Asn	Lys	Val	Asn	Pro	
1			5					10					15			
cga	ggc	ccc	cta	atc	ccc	tta	att	ctt	ctg	atg	ctc	aga	ggg	gtc	agt	96
Arg	Gly	Pro	Leu	Ile	Pro	Leu	Ile	Leu	Leu	Met	Leu	Arg	Gly	Val	Ser	
			20					25					30			
act	gct	tcg	ccc	ggc	tcc	agt	gcg	gcc	cag	ccg	gcc	gaa	ggg	atc	tgc	144
Thr	Ala	Ser	Pro	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Glu	Gly	Ile	Cys	
		35					40					45				
agg	aat	cgt	gtg	act	aat	aat	gta	aaa	gac	gtc	act	aaa	ttg	gtg	gca	192
Arg	Asn	Arg	Val	Thr	Asn	Asn	Val	Lys	Asp	Val	Thr	Lys	Leu	Val	Ala	
	50					55					60					
aat	ctt	cca	aaa	gac	tac	atg	ata	acc	ctc	aaa	tat	gtc	ccc	ggg	atg	240
Asn	Leu	Pro	Lys	Asp	Tyr	Met	Ile	Thr	Leu	Lys	Tyr	Val	Pro	Gly	Met	
65					70					75					80	

ES 2 426 089 T3

gat gtt ttg cca agt cat tgt tgg ata agc gag atg gta gta caa ttg	288
Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu Met Val Val Gln Leu	
85 90 95	
tca gac agc ttg act gat ctt ctg gac aag ttt tca aat att tct gaa	336
Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe Ser Asn Ile Ser Glu	
100 105 110	
ggc ttg agt aat tat tcc atc ata gac aaa ctt gtg aat ata gtc gat	384
Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu Val Asn Ile Val Asp	
115 120 125	
gac ctt gtg gag tgc gtc aaa gaa aac tca tct aag gat cta aaa aaa	432
Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser Ser Lys Asp Leu Lys Lys	
130 135 140	
tca ttc aag agc cca gaa ccc agg ctc ttt act cct gaa gaa ttc ttt	480
Ser Phe Lys Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe Thr Pro Glu Glu Phe Phe	
145 150 155 160	
aga att ttt aat aga tcc att gat gcc ttc aag gac ttt gta gtg gca	528
Arg Ile Phe Asn Arg Ser Ile Asp Ala Phe Lys Asp Phe Val Val Ala	
165 170 175	
tct gaa act agt gat tgt gtg gtt tct tca aca tta agt cct gag aaa	576
Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val Ser Ser Thr Leu Ser Pro Glu Lys	
180 185 190	
gat tcc aga gtc agt gtc aca aaa cca ttt atg tta ccc cct gtt gca	624
Asp Ser Arg Val Ser Val Thr Lys Pro Phe Met Leu Pro Pro Val Ala	
195 200 205	
gcc agc tcc ctt agg aat gac agc agt agc agt aat agg aag gcc aaa	672
Ala Ser Ser Leu Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Asn Arg Lys Ala Lys	
210 215 220	
aat ccc cct gga gac tcc agc cta cac gcg gcc gca atc gag gga agg	720
Asn Pro Pro Gly Asp Ser Ser Leu His Ala Ala Ile Glu Gly Arg	
225 230 235 240	
caa gac ctt cca gga aat gac aac agc gac aaa att tgt ctt gga cat	768
Gln Asp Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Asp Lys Ile Cys Leu Gly His	
245 250 255	
cat gct gta tca aat ggc acc aaa gta aac aca ctc act gag aga gga	816
His Ala Val Ser Asn Gly Thr Lys Val Asn Thr Leu Thr Glu Arg Gly	
260 265 270	
gta gaa gtt gtc aat gca acg gaa aca gtg gag cgg aca aac atc ccc	864
Val Glu Val Val Asn Ala Thr Glu Thr Val Glu Arg Thr Asn Ile Pro	
275 280 285	
aaa att tgc tca aaa ggg aaa aga acc act gat ctt ggc caa tgc gga	912
Lys Ile Cys Ser Lys Gly Lys Arg Thr Thr Asp Leu Gly Gln Cys Gly	
290 295 300	
ctg tta ggg acc att acc gga cca cct caa tgc gac caa ttt cta gaa	960
Leu Leu Gly Thr Ile Thr Gly Pro Pro Gln Cys Asp Gln Phe Leu Glu	
305 310 315 320	

ES 2 426 089 T3

ttt tca gct gat cta ata atc gag aga cga gaa gga aat gat gtt tgt	1008
Phe Ser Ala Asp Leu Ile Ile Glu Arg Arg Glu Gly Asn Asp Val Cys	
325 330 335	
tac ccg ggg aag ttt gtt aat gaa gag gca ttg cga caa atc ctc aga	1056
Tyr Pro Gly Lys Phe Val Asn Glu Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Arg	
340 345 350	
gga tca ggt ggg att gac aaa gaa aca atg gga ttc aca tat agt gga	1104
Gly Ser Gly Gly Ile Asp Lys Glu Thr Met Gly Phe Thr Tyr Ser Gly	
355 360 365	
ata agg acc aac gga aca act agt gca tgt aga aga tca ggg tct tca	1152
Ile Arg Thr Asn Gly Thr Thr Ser Ala Cys Arg Arg Ser Gly Ser Ser	
370 375 380	
ttc tat gca gaa atg gag tgg ctc ctg tca aat aca gac aat gct tct	1200
Phe Tyr Ala Glu Met Glu Trp Leu Leu Ser Asn Thr Asp Asn Ala Ser	
385 390 395 400	
ttc cca caa atg aca aaa tca tac aaa aac aca agg aga gaa tca gct	1248
Phe Pro Gln Met Thr Lys Ser Tyr Lys Asn Thr Arg Arg Glu Ser Ala	
405 410 415	
ctg ata gta tgg gga atc cac cat tca gga tca acc acc gaa cag acc	1296
Leu Ile Val Trp Gly Ile His His Ser Gly Ser Thr Thr Glu Gln Thr	
420 425 430	
aaa cta tat ggg agt gga aat aaa ctg ata aca gtc ggg agt tcc aaa	1344
Lys Leu Tyr Gly Ser Gly Asn Lys Leu Ile Thr Val Gly Ser Ser Lys	
435 440 445	
tat cat caa tct ttt gtg ccg agt cca gga aca cga ccg cag ata aat	1392
Tyr His Gln Ser Phe Val Pro Ser Pro Gly Thr Arg Pro Gln Ile Asn	
450 455 460	
ggc cag tcc gga cgg att gat ttt cat tgg ttg atc ttg gat ccc aat	1440
Gly Gln Ser Gly Arg Ile Asp Phe His Trp Leu Ile Leu Asp Pro Asn	
465 470 475 480	
gat aca gtt act ttt agt ttc aat ggg gct ttc ata gct cca aat cgt	1488
Asp Thr Val Thr Phe Ser Phe Asn Gly Ala Phe Ile Ala Pro Asn Arg	
485 490 495	
gcc agc ttc ttg agg gga aag tcc atg ggg atc cag agc gat gtg cag	1536
Ala Ser Phe Leu Arg Gly Lys Ser Met Gly Ile Gln Ser Asp Val Gln	
500 505 510	
gtt gat gcc aat tgc gaa ggg gaa tgc tac cac agt gga ggg act ata	1584
Val Asp Ala Asn Cys Glu Gly Glu Cys Tyr His Ser Gly Gly Thr Ile	
515 520 525	
aca agc aga ttg cct ttt caa aac atc aat agc aga gca gtt ggc aaa	1632
Thr Ser Arg Leu Pro Phe Gln Asn Ile Asn Ser Arg Ala Val Gly Lys	
530 535 540	
tgc cca aga tat gta aaa cag gaa agt tta tta ttg gca act ggg atg	1680
Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Glu Ser Leu Leu Leu Ala Thr Gly Met	
545 550 555 560	
aag aac gtt ccc gaa cct tcc aaa aaa agg aaa aaa aga ggc ctg ttt	1728

ES 2 426 089 T3

Lys	Asn	Val	Pro	Glu	Pro	Ser	Lys	Lys	Arg	Lys	Lys	Arg	Gly	Leu	Phe		
				565					570					575			
ggc	gct	ata	gca	ggg	ttt	att	gaa	aat	ggg	tgg	gaa	ggg	ctg	gtc	gac		1776
Gly	Ala	Ile	Ala	Gly	Phe	Ile	Glu	Asn	Gly	Trp	Glu	Gly	Leu	Val	Asp		
			580					585					590				
ggg	tgg	tac	ggg	ttc	agg	cat	cag	aat	gca	caa	gga	gaa	gga	act	gca		1824
Gly	Trp	Tyr	Gly	Phe	Arg	His	Gln	Asn	Ala	Gln	Gly	Glu	Gly	Thr	Ala		
		595					600					605					
gca	gac	tac	aaa	agc	acc	caa	tcg	gca	att	gat	cag	ata	acc	gga	aag		1872
Ala	Asp	Tyr	Lys	Ser	Thr	Gln	Ser	Ala	Ile	Asp	Gln	Ile	Thr	Gly	Lys		
	610					615					620						
tta	aat	aga	ctc	att	gag	aaa	acc	aac	cag	caa	ttt	gag	cta	ata	gat		1920
Leu	Asn	Arg	Leu	Ile	Glu	Lys	Thr	Asn	Gln	Gln	Phe	Glu	Leu	Ile	Asp		
	625				630					635					640		
aat	gaa	ttc	act	gag	gtg	gaa	aag	cag	att	ggc	aat	tta	att	aac	tgg		1968
Asn	Glu	Phe	Thr	Glu	Val	Glu	Lys	Gln	Ile	Gly	Asn	Leu	Ile	Asn	Trp		
				645					650					655			
acc	aaa	gac	tcc	atc	aca	gaa	gta	tgg	tct	tac	aat	gct	gaa	ctt	att		2016
Thr	Lys	Asp	Ser	Ile	Thr	Glu	Val	Trp	Ser	Tyr	Asn	Ala	Glu	Leu	Ile		
			660					665					670				
gtg	gca	atg	gaa	aac	cag	cac	act	att	gat	ttg	gct	gat	tca	gag	atg		2064
Val	Ala	Met	Glu	Asn	Gln	His	Thr	Ile	Asp	Leu	Ala	Asp	Ser	Glu	Met		
		675					680					685					
aac	agg	ctg	tat	gag	cga	gtg	agg	aaa	caa	tta	agg	gaa	aat	gct	gaa		2112
Asn	Arg	Leu	Tyr	Glu	Arg	Val	Arg	Lys	Gln	Leu	Arg	Glu	Asn	Ala	Glu		
	690					695					700						
gag	gat	ggg	act	ggg	tgc	ttt	gaa	att	ttt	cat	aaa	tgt	gac	gat	gat		2160
Glu	Asp	Gly	Thr	Gly	Cys	Phe	Glu	Ile	Phe	His	Lys	Cys	Asp	Asp	Asp		
	705				710					715					720		
tgt	atg	gct	agt	ata	agg	aac	aat	act	tat	gat	cac	agc	aaa	tac	aga		2208
Cys	Met	Ala	Ser	Ile	Arg	Asn	Asn	Thr	Tyr	Asp	His	Ser	Lys	Tyr	Arg		
				725					730					735			
gaa	gaa	gcg	atg	caa	aat	aga	ata	caa	att	gac	cca	gtc	aaa	ttg	agt		2256
Glu	Glu	Ala	Met	Gln	Asn	Arg	Ile	Gln	Ile	Asp	Pro	Val	Lys	Leu	Ser		
			740					745					750				
agt	ggc	tac	aaa	gat	gtg	ata	ctt	tgg	ttt	agc	ttc	ggg	gca	tca	tgc		2304
Ser	Gly	Tyr	Lys	Asp	Val	Ile	Leu	Trp	Phe	Ser	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys		
		755					760					765					
ttt	ttg	ctt	ctt	gcc	att	gca	atg	ggc	ctt	gtt	ttc	ata	tgt	gtg	aag		2352
Phe	Leu	Leu	Leu	Ala	Ile	Ala	Met	Gly	Leu	Val	Phe	Ile	Cys	Val	Lys		
		770				775						780					
aac	gga	aac	atg	cgg	tgc	act	att	tgt	ata	taa							2385
Asn	Gly	Asn	Met	Arg	Cys	Thr	Ile	Cys	Ile								
	785				790												

<210> 4

<211> 794

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fusión de la citocina del SCF, el dominio del extremo N de la glicoproteína hemaglutinina de un virus de la gripe, y un péptido señal

10

<400> 4

ES 2 426 089 T3

Met Ala Arg Ser Thr Leu Ser Lys Pro Leu Lys Asn Lys Val Asn Pro  
 1 5 10 15

Arg Gly Pro Leu Ile Pro Leu Ile Leu Leu Met Leu Arg Gly Val Ser  
 20 25 30

Thr Ala Ser Pro Gly Ser Ser Ala Ala Gln Pro Ala Glu Gly Ile Cys  
 35 40 45

Arg Asn Arg Val Thr Asn Asn Val Lys Asp Val Thr Lys Leu Val Ala  
 50 55 60

Asn Leu Pro Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu Lys Tyr Val Pro Gly Met  
 65 70 75 80

Asp Val Leu Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu Met Val Val Gln Leu  
 85 90 95

Ser Asp Ser Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe Ser Asn Ile Ser Glu  
 100 105 110

Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu Val Asn Ile Val Asp  
 115 120 125

Asp Leu Val Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser Ser Lys Asp Leu Lys Lys  
 130 135 140

Ser Phe Lys Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe Thr Pro Glu Glu Phe Phe  
 145 150 155 160

Arg Ile Phe Asn Arg Ser Ile Asp Ala Phe Lys Asp Phe Val Val Ala  
 165 170 175

Ser Glu Thr Ser Asp Cys Val Val Ser Ser Thr Leu Ser Pro Glu Lys  
 180 185 190

Asp Ser Arg Val Ser Val Thr Lys Pro Phe Met Leu Pro Pro Val Ala  
 195 200 205

ES 2 426 089 T3

Ala Ser Ser Leu Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Asn Arg Lys Ala Lys  
 210 215 220

Asn Pro Pro Gly Asp Ser Ser Leu His Ala Ala Ala Ile Glu Gly Arg  
 225 230 235 240

Gln Asp Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Asp Lys Ile Cys Leu Gly His  
 245 250 255

His Ala Val Ser Asn Gly Thr Lys Val Asn Thr Leu Thr Glu Arg Gly  
 260 265 270

Val Glu Val Val Asn Ala Thr Glu Thr Val Glu Arg Thr Asn Ile Pro  
 275 280 285

Lys Ile Cys Ser Lys Gly Lys Arg Thr Thr Asp Leu Gly Gln Cys Gly  
 290 295 300

Leu Leu Gly Thr Ile Thr Gly Pro Pro Gln Cys Asp Gln Phe Leu Glu  
 305 310 315 320

Phe Ser Ala Asp Leu Ile Ile Glu Arg Arg Glu Gly Asn Asp Val Cys  
 325 330 335

Tyr Pro Gly Lys Phe Val Asn Glu Glu Ala Leu Arg Gln Ile Leu Arg  
 340 345 350

Gly Ser Gly Gly Ile Asp Lys Glu Thr Met Gly Phe Thr Tyr Ser Gly  
 355 360 365

Ile Arg Thr Asn Gly Thr Thr Ser Ala Cys Arg Arg Ser Gly Ser Ser  
 370 375 380

Phe Tyr Ala Glu Met Glu Trp Leu Leu Ser Asn Thr Asp Asn Ala Ser  
 385 390 395 400

Phe Pro Gln Met Thr Lys Ser Tyr Lys Asn Thr Arg Arg Glu Ser Ala  
 405 410 415

Leu Ile Val Trp Gly Ile His His Ser Gly Ser Thr Thr Glu Gln Thr  
 420 425 430

Lys Leu Tyr Gly Ser Gly Asn Lys Leu Ile Thr Val Gly Ser Ser Lys  
 435 440 445

ES 2 426 089 T3

Tyr His Gln Ser Phe Val Pro Ser Pro Gly Thr Arg Pro Gln Ile Asn  
 450 455 460

Gly Gln Ser Gly Arg Ile Asp Phe His Trp Leu Ile Leu Asp Pro Asn  
 465 470 475 480

Asp Thr Val Thr Phe Ser Phe Asn Gly Ala Phe Ile Ala Pro Asn Arg  
 485 490 495

Ala Ser Phe Leu Arg Gly Lys Ser Met Gly Ile Gln Ser Asp Val Gln  
 500 505 510

Val Asp Ala Asn Cys Glu Gly Glu Cys Tyr His Ser Gly Gly Thr Ile  
 515 520 525

Thr Ser Arg Leu Pro Phe Gln Asn Ile Asn Ser Arg Ala Val Gly Lys  
 530 535 540

Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Glu Ser Leu Leu Leu Ala Thr Gly Met  
 545 550 555 560 565

Lys Asn Val Pro Glu Pro Ser Lys Lys Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe  
 565 570 575

Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Leu Val Asp  
 580 585 590

Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ala Gln Gly Glu Gly Thr Ala  
 595 600 605

Ala Asp Tyr Lys Ser Thr Gln Ser Ala Ile Asp Gln Ile Thr Gly Lys  
 610 615 620

Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr Asn Gln Gln Phe Glu Leu Ile Asp  
 625 630 635 640

Asn Glu Phe Thr Glu Val Glu Lys Gln Ile Gly Asn Leu Ile Asn Trp  
 645 650 655

Thr Lys Asp Ser Ile Thr Glu Val Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Ile  
 660 665 670

Val Ala Met Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Ala Asp Ser Glu Met  
 675 680 685

Asn Arg Leu Tyr Glu Arg Val Arg Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu



ES 2 426 089 T3

Met Lys Leu Pro Thr Gly Met Val Ile Leu Cys Ser Leu Ile Ile Val  
1 5 10 15

Arg Ala Gly Phe Asp Asp Pro Arg Lys Ala Ile Ala Leu Val Gln Lys  
20 25 30

Gln His Gly Lys Pro Cys Glu Cys Ser Gly Gly Gln Val Ser Glu Ala  
35 40 45

Pro Pro Asn Ser Ile Gln Gln Val Thr Cys Pro Gly Lys Thr Ala Tyr  
50 55 60

Leu Met Thr Asn Gln Lys Trp Lys Cys Arg Val Thr Pro Lys Ile Ser  
65 70 75 80

Pro Ser Gly Gly Glu Leu Gln Asn Cys Pro Cys Asn Thr Phe Gln Asp  
85 90 95

ES 2 426 089 T3

Ser Met His Ser Ser Cys Tyr Thr Glu Tyr Arg Gln Cys Arg Arg Ile  
100 105 110

Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Ser  
115 120 125

Leu Asn Glu Val Gln Ile Leu Gln Asn Pro Asn Gln Leu Leu Gln Ser  
130 135 140

Pro Cys Arg Gly Ser Ile Asn Gln Pro Val Cys Trp Ser Ala Thr Ala  
145 150 155 160

Pro Ile His Ile Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu Asp Thr Lys Arg Val  
165 170 175

Trp Thr Val Gln Lys Arg Leu Glu Gln Ile His Lys Ala Met Thr Pro  
180 185 190

Glu Leu Gln Tyr His Pro Leu Ala Leu Pro Lys Val Arg Asp Asp Leu  
195 200 205

Ser Leu Asp Ala Arg Thr Phe Asp Ile Leu Asn Thr Thr Phe Arg Leu  
210 215 220

Leu Gln Met Ser Asn Phe Ser Leu Ala Gln Asp Cys Trp Leu Cys Leu  
225 230 235 240

Lys Leu Gly Thr Pro Thr Pro Leu Ala Ile Pro Thr Pro Ser Leu Thr  
245 250 255

Tyr Ser Leu Ala Asp Ser Leu Ala Asn Ala Ser Cys Gln Ile Ile Pro  
260 265 270

Pro Leu Leu Val Gln Pro Met Gln Phe Ser Asn Ser Ser Cys Leu Ser  
275 280 285

Ser Pro Phe Ile Asn Asp Thr Glu Gln Ile Asp Leu Gly Ala Val Thr  
290 295 300

Phe Thr Asn Cys Thr Ser Val Ala Asn Val Ser Ser Pro Leu Cys Ala  
305 310 315 320

Leu Asn Gly Ser Val Phe Leu Cys Gly Asn Asn Met Ala Tyr Thr Tyr  
325 330 335

ES 2 426 089 T3

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

<210> 6  
<211> 33

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Dominio citoplásmico de la glicoproteína de la envoltura A del Virus de la Leucemia Murina

<400> 6

Asn Arg Leu Val Gln Phe Val Lys Asp Arg Ile Ser Val Val Gln Ala  
 1 5 10 15

Leu Val Leu Thr Gln Gln Tyr His Gln Leu Lys Pro Leu Glu Tyr Glu  
 20 25 30

Pro

10

<210> 7  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Péptido señal de la glicoproteína de la envoltura A del Virus de la Leucemia Murina

<400> 7

20

Met Ala Arg Ser Thr Leu Ser Lys Pro Leu Lys Asn Lys Val Asn Pro  
 1 5 10 15

Arg Gly Pro Leu Ile Pro Leu Ile Leu Leu Met Leu Arg Gly Val Ser  
 20 25 30

Thr Ala Ser Pro Gly Ser Ser  
 35

<210> 8  
 <211> 976

25

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 426 089 T3

Met Arg Gly Ala Arg Gly Ala Trp Asp Phe Leu Cys Val Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Leu Leu Arg Val Gln Thr Gly Ser Ser Gln Pro Ser Val Ser Pro Gly  
20 25 30

Glu Pro Ser Pro Pro Ser Ile His Pro Gly Lys Ser Asp Leu Ile Val  
35 40 45

Arg Val Gly Asp Glu Ile Arg Leu Leu Cys Thr Asp Pro Gly Phe Val  
50 55 60

Lys Trp Thr Phe Glu Ile Leu Asp Glu Thr Asn Glu Asn Lys Gln Asn



ES 2 426 089 T3

Thr Thr Val Phe Val Asn Asp Gly Glu Asn Val Asp Leu Ile Val Glu  
 325 330 335

Tyr Glu Ala Phe Pro Lys Pro Glu His Gln Gln Trp Ile Tyr Met Asn  
 340 345 350

Arg Thr Phe Thr Asp Lys Trp Glu Asp Tyr Pro Lys Ser Glu Asn Glu  
 355 360 365

Ser Asn Ile Arg Tyr Val Ser Glu Leu His Leu Thr Arg Leu Lys Gly  
 370 375 380

Thr Glu Gly Gly Thr Tyr Thr Phe Leu Val Ser Asn Ser Asp Val Asn  
 385 390 395 400

Ala Ala Ile Ala Phe Asn Val Tyr Val Asn Thr Lys Pro Glu Ile Leu  
 405 410 415

Thr Tyr Asp Arg Leu Val Asn Gly Met Leu Gln Cys Val Ala Ala Gly  
 420 425 430

Phe Pro Glu Pro Thr Ile Asp Trp Tyr Phe Cys Pro Gly Thr Glu Gln  
 435 440 445

Arg Cys Ser Ala Ser Val Leu Pro Val Asp Val Gln Thr Leu Asn Ser  
 450 455 460

Ser Gly Pro Pro Phe Gly Lys Leu Val Val Gln Ser Ser Ile Asp Ser  
 465 470 475 480

Ser Ala Phe Lys His Asn Gly Thr Val Glu Cys Lys Ala Tyr Asn Asp  
 485 490 495

Val Gly Lys Thr Ser Ala Tyr Phe Asn Phe Ala Phe Lys Gly Asn Asn  
 500 505 510

Lys Glu Gln Ile His Pro His Thr Leu Phe Thr Pro Leu Leu Ile Gly  
 515 520 525

Phe Val Ile Val Ala Gly Met Met Cys Ile Ile Val Met Ile Leu Thr  
 530 535 540

Tyr Lys Tyr Leu Gln Lys Pro Met Tyr Glu Val Gln Trp Lys Val Val  
 545 550 555 560

ES 2 426 089 T3

Glu Glu Ile Asn Gly Asn Asn Tyr Val Tyr Ile Asp Pro Thr Gln Leu  
 565 570 575

Pro Tyr Asp His Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asn Arg Leu Ser Phe Gly  
 580 585 590

Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala  
 595 600 605

Tyr Gly Leu Ile Lys Ser Asp Ala Ala Met Thr Val Ala Val Lys Met  
 610 615 620

Leu Lys Pro Ser Ala His Leu Thr Glu Arg Glu Ala Leu Met Ser Glu  
 625 630 635 640

Leu Lys Val Leu Ser Tyr Leu Gly Asn His Met Asn Ile Val Asn Leu  
 645 650 655

Leu Gly Ala Cys Thr Ile Gly Gly Pro Thr Leu Val Ile Thr Glu Tyr  
 660 665 670

Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu Asn Phe Leu Arg Arg Lys Arg Asp Ser  
 675 680 685

Phe Ile Cys Ser Lys Gln Glu Asp His Ala Glu Ala Ala Leu Tyr Lys  
 690 695 700

Asn Leu Leu His Ser Lys Glu Ser Ser Cys Ser Asp Ser Thr Asn Glu  
 705 710 715 720

Tyr Met Asp Met Lys Pro Gly Val Ser Tyr Val Val Pro Thr Lys Ala  
 725 730 735

Asp Lys Arg Arg Ser Val Arg Ile Gly Ser Tyr Ile Glu Arg Asp Val  
 740 745 750

Thr Pro Ala Ile Met Glu Asp Asp Glu Leu Ala Leu Asp Leu Glu Asp  
 755 760 765

Leu Leu Ser Phe Ser Tyr Gln Val Ala Lys Gly Met Ala Phe Leu Ala  
 770 775 780

Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Ile Leu Leu  
 785 790 795 800

Thr His Gly Arg Ile Thr Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp  
 805 810 815

Ile Lys Asn Asp Ser Asn Tyr Val Val Lys Gly Asn Ala Arg Leu Pro  
 820 825 830

Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asn Cys Val Tyr Thr Phe  
 835 840 845

Glu Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Phe Leu Trp Glu Leu Phe Ser  
 850 855 860

Leu Gly Ser Ser Pro Tyr Pro Gly Met Pro Val Asp Ser Lys Phe Tyr  
 865 870 875 880

Lys Met Ile Lys Glu Gly Phe Arg Met Leu Ser Pro Glu His Ala Pro  
 885 890 895

Ala Glu Met Tyr Asp Ile Met Lys Thr Cys Trp Asp Ala Asp Pro Leu  
 900 905 910

Lys Arg Pro Thr Phe Lys Gln Ile Val Gln Leu Ile Glu Lys Gln Ile  
 915 920 925

Ser Glu Ser Thr Asn His Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Asn Cys Ser Pro  
 930 935 940

Asn Arg Gln Lys Pro Val Val Asp His Ser Val Arg Ile Asn Ser Val  
 945 950 955 960

Gly Ser Thr Ala Ser Ser Ser Gln Pro Leu Leu Val His Asp Asp Val  
 965 970 975

<210> 9

<211> 189

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Dominio extracelular de la citocina del SCF humana

10

<400> 9

ES 2 426 089 T3

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

5 <210> 10  
 <211> 558  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Dominio del extremo N de la hemaglutinina del Virus de la gripe aviar

ES 2 426 089 T3

<400> 10

Ile Glu Gly Arg Gln Asp Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Asp Lys Ile  
1 5 10 15

Cys Leu Gly His His Ala Val Ser Asn Gly Thr Lys Val Asn Thr Leu  
20 25 30

Thr Glu Arg Gly Val Glu Val Val Asn Ala Thr Glu Thr Val Glu Arg  
35 40 45

5

ES 2 426 089 T3

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

Gly Gln Cys Gly Leu Leu Gly Thr Ile Thr Gly Pro Pro Gln Cys Asp  
 65 70 75 80

Gln Phe Leu Glu Phe Ser Ala Asp Leu Ile Ile Glu Arg Arg Glu Gly  
 85 90 95

Asn Asp Val Cys Tyr Pro Gly Lys Phe Val Asn Glu Glu Ala Leu Arg  
 100 105 110

Gln Ile Leu Arg Gly Ser Gly Gly Ile Asp Lys Glu Thr Met Gly Phe  
 115 120 125

Thr Tyr Ser Gly Ile Arg Thr Asn Gly Thr Thr Ser Ala Cys Arg Arg  
 130 135 140

Ser Gly Ser Ser Phe Tyr Ala Glu Met Glu Trp Leu Leu Ser Asn Thr  
 145 150 155 160

Asp Asn Ala Ser Phe Pro Gln Met Thr Lys Ser Tyr Lys Asn Thr Arg  
 165 170 175

Arg Glu Ser Ala Leu Ile Val Trp Gly Ile His His Ser Gly Ser Thr  
 180 185 190

Thr Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gly Ser Gly Asn Lys Leu Ile Thr Val  
 195 200 205

Gly Ser Ser Lys Tyr His Gln Ser Phe Val Pro Ser Pro Gly Thr Arg  
 210 215 220

Pro Gln Ile Asn Gly Gln Ser Gly Arg Ile Asp Phe His Trp Leu Ile  
 225 230 235 240

Leu Asp Pro Asn Asp Thr Val Thr Phe Ser Phe Asn Gly Ala Phe Ile  
 245 250 255

Ala Pro Asn Arg Ala Ser Phe Leu Arg Gly Lys Ser Met Gly Ile Gln  
 260 265 270

Ser Asp Val Gln Val Asp Ala Asn Cys Glu Gly Glu Cys Tyr His Ser  
 275 280 285

ES 2 426 089 T3

Gly Gly Thr Ile Thr Ser Arg Leu Pro Phe Gln Asn Ile Asn Ser Arg  
 290 295 300

Ala Val Gly Lys Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Glu Ser Leu Leu Leu  
 305 310 315 320

Ala Thr Gly Met Lys Asn Val Pro Glu Pro Ser Lys Lys Arg Lys Lys  
 325 330 335

Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu  
 340 345 350

Gly Leu Val Asp Gly Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ala Gln Gly  
 355 360 365

Glu Gly Thr Ala Ala Asp Tyr Lys Ser Thr Gln Ser Ala Ile Asp Gln  
 370 375 380

Ile Thr Gly Lys Leu Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr Asn Gln Gln Phe  
 385 390 395 400

Glu Leu Ile Asp Asn Glu Phe Thr Glu Val Glu Lys Gln Ile Gly Asn  
 405 410 415

Leu Ile Asn Trp Thr Lys Asp Ser Ile Thr Glu Val Trp Ser Tyr Asn  
 420 425 430

Ala Glu Leu Ile Val Ala Met Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Ala  
 435 440 445

Asp Ser Glu Met Asn Arg Leu Tyr Glu Arg Val Arg Lys Gln Leu Arg  
 450 455 460

Glu Asn Ala Glu Glu Asp Gly Thr Gly Cys Phe Glu Ile Phe His Lys  
 465 470 475 480

Cys Asp Asp Asp Cys Met Ala Ser Ile Arg Asn Asn Thr Tyr Asp His  
 485 490 495

Ser Lys Tyr Arg Glu Glu Ala Met Gln Asn Arg Ile Gln Ile Asp Pro  
 500 505 510

Val Lys Leu Ser Ser Gly Tyr Lys Asp Val Ile Leu Trp Phe Ser Phe  
 515 520 525

ES 2 426 089 T3

Gly Ala Ser Cys Phe Leu Leu Leu Ala Ile Ala Met Gly Leu Val Phe  
530 535 540

Ile Cys Val Lys Asn Gly Asn Met Arg Cys Thr Ile Cys Ile  
545 550 555

<210> 11

<211> 6907

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido que codifica la proteína de fusión de la SEQ ID NO: 2

10

<400> 11

ES 2 426 089 T3

gcggccgctc tagagagctt ggcccattgc atacgttgta tccatatcat aatatgtaca 60  
 tttatattgg ctcatgtcca acattaccgc catgttgaca ttgattattg actagttatt 120  
 aatagtaatc aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat 180  
 aacttacggt aatggccccg cctggctgac cgcccaacga cccccgcca ttgacgtcaa 240  
 taatgacgta tgttcccata gtaacgcca tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg 300  
 agtatttacg gtaaactgcc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc 360  
 cccctattga cgtcaatgac ggtaaattggc ccgcctggca ttatgccag tacatgacct 420  
 tatgggactt tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga 480  
 tgcggttttg gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg ggatttccaa 540  
 gtctccacc cattgacgtc aatgggagtt tgttttggca ccaaaatcaa cgggactttc 600  
 caaaatgtcg taacaactcc gcccattga cgcaaatggg cggtaggctg gtacgggtggg 660  
 aggtctatat aagcagagct cgtttagtga accgtcagat cgctgggaga cgccatccac 720  
 gctgttttga cctccataga agacaccggg accgatccag cctccggtcg accgatcctg 780  
 agaacttcag ggtgagtttg gggacccttg attgttcttt ctttttcgct attgtaaaat 840  
 tcatgttata tggagggggc aaagttttca ggggtgtggt tagaatggga agatgtccct 900  
 tgtatcacca tggaccctca tgataatfff gtttctttca ctttctactc tgttgacaac 960  
 cattgtctcc tcttattttc ttttcatttt ctgtaacttt ttcgttaaac tttagcttgc 1020  
 atttgtaacg aatttttaaa ttcacttttg tttatttgtc agattgtaag tactttctct 1080  
 aatcactttt ttttcaaggc aatcagggta tattatattg tacttcagca cagttttaga 1140  
 gaacaattgt tataattaa tgataaggta gaatatttct gcatataaat tctggctggc 1200  
 gtggaaatat tcttattggt agaaacaact acaccctggt catcatcctg cttttctctt 1260  
 tatggttaca atgatataca ctgtttgaga tgaggataaa atactctgag tccaaaccgg 1320

ES 2 426 089 T3

gccctctgc taaccatggt catgccttct tctctttcct acagctcctg ggcaacgtgc 1380  
 tggttggtgt gctgtctcat cattttggca aagaattcct cgacggatcc ctcgattaag 1440  
 ataagactct cccgtgtctg actgctaate caccttgtcc ctgtactaac ccaaaatgaa 1500  
 actccaaca ggaatggtca ttttatgtag cctaataata gttcgggagc ggtttgacga 1560  
 cccccgcaag gctatcgcac tagtacaaaa acaacatggt aaacatgagc aatgcagcgg 1620  
 agggcaggta tccgaggccc caccgaactc catccaacag gtaacttgcc caggcaagac 1680  
 ggctactta atgaccaacc aaaaatggaa atgcagagtc actccaaaaa tctcaactag 1740  
 cgggggagaa ctccagaact gccctgtaa cactttccag gactcgatgc acagttcttg 1800  
 ttatactgaa taccggcaat gcaggcgaat taataagaca tactacacgg ccaccttgct 1860  
 taaaatacgg tctgggagcc tcaacgaggt acagatatta caaaaccca atcagctcct 1920  
 acagtccctt ttaggggct ctataaatca gccggttgc tggagtgcc cagccccat 1980  
 ccatatctcc gatggtggag gaccctcga tactaagaga gtgtggacag tccaaaaaag 2040  
 gctagaacaa attcataagg ctatgactcc tgaacttcaa taccacctt tagcctgccc 2100  
 caaagtcaga gatgacctta gccttgatgc acggactttt gatatcctga ataccacttt 2160  
 taggttactc cagatgtcca attttagcct tgccaagat tgttggctct gtttaaaact 2220  
 agtaccctt accctcttg cgatacccac tccctcttta acctactccc tagcagactc 2280  
 cctagcgaat gcctcctgtc agattatacc tcccctcttg gttcaaccga tgcagttctc 2340  
 caactcgtcc tgtttatctt ccccttcat taacgatacg gaacaaatag acttaggtgc 2400  
 agtcaccttt actaactgca cctctgtagc caatgtcagt agtcctttat gtgcctaaa 2460  
 cgggtcagtc ttctctgtg gaaataacat ggcatacc tatttacctt aaaactggac 2520  
 cagactttgc gtccaagcct cctcctccc cgacattgac atcaaccgg gggatgagcc 2580  
 agtcccatt cctgccattg atcattatat acatagacct aaacgagctg tacagttcat 2640  
 ccctttacta gctggactgg gaatcaccgc agcattcacc accggagcta caggcctagg 2700  
 tgtctccgtc acccagtata caaaattatc ccatcagtta atatctgatg tccaagtctt 2760  
 atccgggtacc atacaagatt tacaagacca ggtagactcg ttagctgaag tagttctcca 2820  
 aataggagg ggactggacc tactaacggc agaacaagga ggaatttgt tagccttaca 2880  
 agaaaaatgc tgtttttatg ctaacaagtc aggaattgtg agaaacaaaa taagaacctt 2940  
 acaagaagaa ttacaaaaac gcagggaag cctggcatcc aaccctctct ggaccgggct 3000  
 gcagggcttt ctccgtacc tctacctct cctgggacct ctactacctt tctactcat 3060  
 actaaccatt gggccatgag ttttcaatcg attagttcaa tttgttaaag acaggatctc 3120  
 agtagtccag gctttagtcc tgactcaaca ataccaccag ctaaaaccac tagaatacga 3180

ES 2 426 089 T3

gccgtgacca tgggtgctggc ccagcaatac caagcactca aagctgagga agaagctcag 3240  
 gattgagctt cggggacaaa agcagggggg aatgagaagt cagaaccccc cacctttgct 3300  
 acataaataa ccgctttcat ttcgcttctg taaaaccgct tatgcgcccc accctaaccg 3360  
 ctttcatttc gcttctgtaa aaccgcttat gcgccccacc ctagccggaa agtccccagc 3420  
 cgctacgcaa cccgggcccc gagttgcatc agccgttcgc aaccgggct ccgagttgca 3480  
 tcagccgaaa gaaacttcat ttcccaagct tcgagggatc cgtcgaggaa ttcactcctc 3540  
 aggtgcaggc tgcctatcag aagggtggtg ctggtgtggc caatgcctg gctcacaat 3600  
 accactgaga tctttttccc tctgcaaaa attatgggga catcatgaag ccccttgagc 3660  
 atctgacttc tggctaataa aggaaattta ttttcattgc aatagtgtgt tggaaatfff 3720  
 tgtgtctctc actcggaagg acatatggga gggcaaatca tttaaaacat cagaatgagt 3780  
 atttggttta gagtttgga acatatgccc atatgctggc tgccatgaac aaaggttggc 3840  
 tataaagagg tcatcagtat atgaaacagc cccctgctgt ccattcctta ttccatagaa 3900  
 aagccttgac ttgaggttag atttttttta tattttgttt tgtgttattt ttttctttaa 3960  
 catccctaaa attttctta catgttttac tagccagatt tttcctctc tctgactac 4020  
 tcccagtcat agctgtccct cttctcttat ggagatccct cgacggatcg gcccaattc 4080  
 gtaatcatgt catagctgtt tctgtgtga aattgttacc cgctcacaat tccacacaac 4140  
 atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tgggggtgct aatgagtgag ctaactcaca 4200  
 ttaattgcgt tgcgctcact gcccgctttc cagtccggaa acctgtctg ccagctgcat 4260  
 taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc 4320  
 tcgctcactg actcgctgcg ctcggtcggt cggtcgggc gagcggatc agctcactca 4380  
 aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca 4440  
 aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg 4500  
 ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagaggtg gcgaaaaccg 4560  
 acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgcg ctctcctggt 4620  
 ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt 4680  
 tctcatagct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc 4740  
 tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgctgcgctt tatccggtaa ctatcgtctt 4800  
 gagtocaacc cggtaaagaca cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt 4860  
 agcagagcga ggtatgtagg cgggtctaca gagttcttga agtgggtggc taactacggc 4920  
 tacactagaa gaacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac ctccggaaaa 4980

ES 2 426 089 T3

agagttggta gctcttgatc eggcaaaaca accaccgctg gtagcggtag tttttttggt 5040  
 tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct 5100  
 acggggctctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta 5160  
 tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaataat gaagttttaa atcaatctaa 5220  
 agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc 5280  
 tcagcgcctc gtctatttgc ttcacccata gttgcctgac tccccgctgt gtagataact 5340  
 acgatacggg agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgac 5400  
 tcaccggctc cagatttacc agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt 5460  
 ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgcgggga agctagagta 5520  
 agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttggtgcca ttgctacagg catcgtggtg 5580  
 tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc aaggcgagtt 5640  
 acatgatccc ccatgttggt caaaaaagcg ggttagctcc ttcggctcctc cgatcgttgt 5700  
 cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct 5760  
 tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt 5820  
 ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccc gcgtcaatac gggataatac 5880  
 cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa 5940  
 actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa 6000  
 ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca 6060  
 aaatgccgca aaaaaggga taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctt 6120  
 ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga 6180  
 atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc 6240  
 taaattgtaa gcgttaatat tttgttaaaa ttcgcgttaa atttttgtta aatcagctca 6300  
 ttttttaacc aataggccga aatcggcaaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag 6360  
 atagggttga gtggtgttcc agtttggaac aagagtccac tattaagaa cgtggactcc 6420  
 aacgtcaaag ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcacc 6480  
 taatcaagtt ttttggggtc gaggtgccgt aaagcactaa atcggaacc taaagggagc 6540  
 ccccgattta gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa 6600  
 gcgaaaggag cgggcgctag ggcgctggca agtgtagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc 6660  
 acacccgccc cgcttaatgc gccgctacag ggcgctccc attcgccatt caggctgcgc 6720  
 aactgttggg aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat tacgccagct ggcgaaaggg 6780  
 ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt tttcccagtc acgacgttgt 6840

ES 2 426 089 T3

aaaacgacgg ccagtgagcg cgcgtaatac gactcactat agggcgaatt ggagctccac 6900

cgcggtg 6907

<210> 12

<211> 7269

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido que codifica la proteína de fusión de la SEQ ID NO: 4

10

<400> 12

ES 2 426 089 T3

gatctttttc	cctctgccaa	aaattatggg	gacatcatga	agccccttga	gcatctgact	60
tctggcta	aaaggaaatt	tattttcatt	gcaatagtgt	gttggaaatt	tttgtgtctc	120
tcaactcggaa	ggacatatgg	gagggcaaat	catttaaaac	atcagaatga	gtatttggtt	180
tagagttag	caacatatgc	ccatatgctg	gctgccatga	acaaagggtg	gctataaaga	240
ggcatcag	atatgaaca	gccccctgct	gtccattcct	tattccatag	aaaagccttg	300
acttgaggt	agatTTTTT	tatatTTTgt	tttgtgttat	TTTTTcttt	aacatcccta	360
aaatTTTct	tacatgTTTT	actagccaga	TTTTTctctc	tctctgact	actcccagtc	420
atagctgtcc	ctcttctctt	atggagatcc	ctcgacggat	cggccgcaat	tcgtaatcat	480
gtcatagctg	tttctgtgt	gaaattgtta	tccgctcaca	attccacaca	acatacgagc	540
cggaagcata	aagtgtaaag	cctgggggtgc	ctaatgagtg	agctaactca	cattaattgc	600
gttgcgctca	ctgcccgtt	tccagtcggg	aaacctgtcg	tgccagctgc	attaatgaat	660
cggccaacgc	gcggggagag	gcggtttgog	tattgggcgc	tcttccgctt	cctcgctcac	720
tgactcgctg	cgctcggtcg	ttcggctgog	gcgagcggta	tcagctcact	caaaggcgg	780
aatacggta	tccacagaat	caggggataa	cgcaggaaag	aacatgtgag	caaaaggcca	840
gcaaaaggcc	aggaaccgta	aaaaggccgc	gttgctggcg	TTTTTccata	ggctccgccc	900
ccctgacgag	catcacaaaa	atcgaogctc	aagtcaagg	tggcgaaacc	cgacaggact	960
ataaagatac	caggcgTTTc	cccctggaag	ctccctcgtg	cgctctcctg	ttccgacct	1020
gccgcttacc	ggatacctgt	ccgcctttct	cccttcggga	agcgtggcgc	tttctcatag	1080
ctcacgctgt	aggtatctca	gttcgggtgta	ggtcgttcgc	tccaagctgg	gctgtgtgca	1140
cgaaccccc	gttcagcccg	accgctgcgc	cttatccggt	aactatcgtc	ttgagtccaa	1200
cccggtaaga	cacgacttat	cgccactggc	agcagccact	ggtaacagga	ttagcagagc	1260
gaggtatgta	ggcgggtgcta	cagagtTctt	gaagtgggtg	cctaactacg	gctacactag	1320
aagaacagta	tttggtatct	gcgctctgct	gaagccagtt	accttcggaa	aaagagttgg	1380

ES 2 426 089 T3

tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca 1440  
gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacgggggc 1500  
tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcattgagat tatcaaaaag 1560  
gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aatcaatct aaagtatata 1620  
tgagtaaact tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat 1680  
ctgtctatth cgttcatcca tagttgctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg 1740  
ggagggctta ccatctggcc ccagtgtgct aatgataccg cgagaccac gctcaccggc 1800  
tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagegcagaa gtggtcctgc 1860  
aaactttatcc gcctccatcc agtctattaa ttggtgccgg gaagctagag taagtagttc 1920  
gccagttaat agtttgcgca acgttgttgc cattgctaca ggcattctgg tgcacgctc 1980  
gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc 2040  
ccccatgttg tgcaaaaaag cgggttagct ccttcgggtcc tccgatcgtt gtcagaagta 2100  
agttggccgc agtgttatca ctcatgggta tggcagcact gcataattct cttactgtca 2160  
tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat 2220  
agtgtatgcg gcgaccgagt tgccttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac 2280  
atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa 2340  
ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tctgtcacc aactgatctt 2400  
cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg 2460  
caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat 2520  
attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt 2580  
agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtcca cctaaattgt 2640  
aagcgttaat attttgtaa aattcgcgtt aaatttttgt taaatcagct cattttttaa 2700  
ccaataggcc gaaatcggca aatccotta taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt 2760  
gagtgttgtt ccagtttga acaagagtcc actattaaag aacgtggact ccaacgtcaa 2820  
agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg cccactacgt gaaccatcac cctaatcaag 2880  
ttttttgggg tgcaggtgcc gtaaagcact aaatcggaac cctaaaggga gccccgatt 2940  
tagagcttga cggggaaagc cggcgaacgt ggcgagaaag gaagggaaga aagcgaagg 3000  
agcgggctg agggcgctgg caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca ccacaccgc 3060  
cgcgcttaat gcgcgctac agggcgctc ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg 3120  
ggaagggcga tccgtcggg cctcttogct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc 3180  
tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac 3240

ES 2 426 089 T3

ggccagtgag cgcgcgtaat acgactcact atagggcgaa ttggagctcc accgcggtgg 3300  
cggccggccg cgctctagag agcttgccc attgcatagc ttgtatccat atcataatat 3360  
gtacatttat attggctcat gtccaacatt accgccatgt tgacattgat tattgactag 3420  
ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgctg 3480  
tacataactt acggtaaata gcccgcctgg ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac 3540  
gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg 3600  
ggtaggagat ttacggtaaa ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag 3660  
tacgccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccgcc tggcattatg cccagtacat 3720  
gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta ttagtcatcg ctattaccat 3780  
ggtagatgcg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact cacggggatt 3840  
tccaagtctc caccaccattg acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga 3900  
ctttccaaa tgtcgtaaca actccgcccc attgacgcaa atgggcggtg ggcgtgtacg 3960  
gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcgctt ggagacgcca 4020  
tccacgctgt tttgacctc atagaagaca ccgggaccga tccagcctcc ggtcgaccga 4080  
tctgagaac ttcaggggtg gtttggggac ccttgattgt tctttctttt tcgctattgt 4140  
aaaattcatg ttatatggag ggggcaaagt tttcaggggtg ttgttttagaa tgggaagatg 4200  
tccttgtat caccatggac cctcatgata attttgtttc tttcactttc tactctgttg 4260  
acaaccattg tctcctctta ttttcttttc attttctgta actttttcgt taaactttag 4320  
cttgcatctg taacgaattt ttaaattcac ttttgtttat ttgtcagatt gtaagtactt 4380  
tctctaatac cttttttttc aaggcaatca gggatatatta tattgtactt cagcacagtt 4440  
ttagagaaca attgttataa ttaaatagata aggtagaata tttctgcata taaattctgg 4500  
ctggcgtgga aatattctta ttggtagaaa caactacacc ctggtcacat tcttgccttt 4560  
ctctttatgg ttacaatgat atacactgtt tgagatgagg ataaaatact ctgagtccaa 4620  
accgggcccc tctgctaacc atgttcatgc cttcttctct ttctacagc tcttgggcaa 4680  
cgtgctggtt gttgtgctgt ctcatcattt tggcaaagaa ttctagactg acatggcgcg 4740  
ttcaacgctc tcaaaaacccc ttaaaaataa ggttaacccg cgaggcccc taatccccct 4800  
aattcttctg atgctcagag gggtcagtac tgcttcgccc ggctccagtg cggcccagcc 4860  
ggcgaaggg atctgcagga atcgtgtgac taataatgta aaagacgtca ctaaattggt 4920  
ggcaaatctt ccaaaagact acatgataac cctcaaataat gtccccggga tggatgtttt 4980  
gccaaagtc tgttggataa gcgagatggt agtacaattg tcagacagct tgactgatct 5040

ES 2 426 089 T3

tctggacaag ttttcaata tttctgaagg cttgagtaat tattccatca tagacaaact 5100  
 tgtgaatata gtcgatgacc ttgtggagtg cgtcaaagaa aactcatcta aggatctaaa 5160  
 aaaatcattc aagagcccag aaccaggct ctttactcct gaagaattct ttagaatttt 5220  
 taatagatcc attgatgcct tcaaggactt tgtagtggca tctgaaacta gtgattgtgt 5280  
 ggtttcttca acattaagtc ctgagaaaga ttccagagtc agtgtcacia aaccatttat 5340  
 gttacccoct gttgcagcca gtcoccttag gaatgacagc agtagcagta ataggaaggc 5400  
 caaaaatccc cctggagact ccagcctaca cgcggccgca atcgaggga ggcaagacct 5460  
 tccaggaat gacaacagcg acaaaatttg tcttggacat catgctgtat caaatggcac 5520  
 caaagtaaac aactcactg agagaggagt agaagttgtc aatgcaacgg aacagtgga 5580  
 gcggacaaac atccccaaaa tttgctcaaa agggaaaaga accactgac ttggccaatg 5640  
 cggactgtta gggaccatta ccggaccacc tcaatgagc caatttctag aattttcagc 5700  
 tgatctaata atcgagagac gagaaggaaa tgatgtttgt taccgggga agtttgttaa 5760  
 tgaagaggca ttgcgacaaa tcctcagagg atcaggtggg attgacaaag aaacaatggg 5820  
 attcacatat agtgaataa ggaccaacgg aacaactagt gcatgtagaa gatcagggtc 5880  
 ttcattctat gcagaaatgg agtggctcct gtcaaataca gacaatgctt ctttcccaca 5940  
 aatgacaaaa tcatacaaaa acacaaggag agaatcagct ctgatagtat ggggaatcca 6000  
 ccattcagga tcaaccaccg aacagaccaa actatatggg agtggaaata aactgataac 6060  
 agtcgggagt tccaaatc atcaatcttt tgtgccgagt ccaggaacac gaccgcagat 6120  
 aaatggccag tccggacgga ttgatattca ttggttgatc ttggatcca atgatacagt 6180  
 tacttttagt ttcaatgggg ctttcatagc tccaaatcgt gccagcttct tgaggggaaa 6240  
 gtccatgggg atccagagcg atgtgcaggt tgatgccaat tgcaagggg aatgctacca 6300  
 cagtggaggg actataacaa gcagattgcc ttttcaaaac atcaatagca gagcagttgg 6360  
 caaatgcca agatatgtaa aacaggaag tttattattg gcaactggga tgaagaacgt 6420  
 tcccgaacct tccaaaaaaa ggaaaaaag aggcctgttt ggcgctatag cagggtttat 6480  
 tgaaaatggt tgggaaggtc tggctgacgg gtggtacggt ttcaggcatc agaatgcaca 6540  
 aggagaagga actgcagcag actacaaaag cacccaatcg gcaattgatc agataaccgg 6600  
 aaagttaaat agactcattg agaaaaccaa ccagcaattt gagctaatag ataataaatt 6660  
 cactgaggtg gaaaagcaga ttggcaattt aattaactgg accaaagact ccatcacaga 6720  
 agtatggtct tacaatgctg aacttattgt ggcaatggaa aaccagcaca ctattgattt 6780  
 ggctgattca gagatgaaca ggctgtatga gcgagtgagg aaacaattaa gggaaaaatgc 6840  
 tgaagaggat ggtactggtt gctttgaaat ttttcataaa tgtgacgatc attgtatggc 6900

ES 2 426 089 T3

tagtataagg	aacaatactt	atgatcacag	caaatacaga	gaagaagcga	tgcaaaatag	6960
aatacaaatt	gaccagtc	aattgagtag	tggctacaaa	gatgtgatac	tttggtttag	7020
cttgggggca	tcatgctttt	tgcttcttgc	cattgcaatg	ggccttgttt	tcatatgtgt	7080
gaagaacgga	aacatgcbgt	gcactatttg	tatataagtt	tggaaaaaaa	cacccttggt	7140
tctactctct	agaggatccc	cgggcgcgaa	cgtggaagat	ccgtcgagga	attcactcct	7200
caggtgcagg	ctgcctatca	gaaggtggtg	gctggtgtgg	ccaatgccct	ggctcacaaa	7260
taccactga						7269

<210> 13

<211> 511

5 <212> PRT

<213> Virus de la estomatitis vesicular

<400> 13

ES 2 426 089 T3

Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys  
 1 5 10 15

Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn  
 20 25 30

Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Leu Asn Trp  
 35 40 45

His Asn Asp Leu Ile Gly Thr Ala Leu Gln Val Lys Met Pro Lys Ser  
 50 55 60

His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ser Lys Trp  
 65 70 75 80

Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr His  
 85 90 95

Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro Ser Val Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile  
 100 105 110

Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln  
 115 120 125

Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Val Ile Val Gln  
 130 135 140

Val Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val  
 145 150 155 160

ES 2 426 089 T3

Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr  
 165 170 175

Val His Asn Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu  
 180 185 190

Cys Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp  
 195 200 205

Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu Gly Thr Gly Phe Arg Ser Asn  
 210 215 220

Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met Gln Tyr Cys  
 225 230 235 240

Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Met Ala  
 245 250 255

Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu Cys Pro Glu Gly  
 260 265 270

Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu Ile  
 275 280 285

Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp  
 290 295 300

Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr  
 305 310 315 320

Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn  
 325 330 335

Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala  
 340 345 350

Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr  
 355 360 365

Glu Arg Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile  
 370 375 380

Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu  
 385 390 395 400

Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser  
 405 410 415

Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln  
 420 425 430

Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys  
 435 440 445

Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser  
 450 455 460

Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu  
 465 470 475 480

Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys  
 485 490 495

Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys  
 500 505 510

<210> 14

<211> 6508

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Plásmido que codifica VSV-G

10

<400> 14

ES 2 426 089 T3

gcggccgctc	tagagagctt	ggcccattgc	atacgttgta	tccatatcat	aatatgtaca	60
tttatattgg	ctcatgtcca	acattaccgc	catgttgaca	ttgattattg	actagttatt	120
aatagtaatc	aattacgggg	tcattagttc	atagcccata	tatggagttc	cgcgttacat	180
aacttacggt	aatggcccc	cctggctgac	cgcccaacga	ccccgcca	ttgacgtcaa	240
taatgacgta	tgttcccata	gtaacgcaa	tagggacttt	ccattgacgt	caatgggtgg	300
agtatttacg	gtaaactgcc	cacttggcag	tacatcaagt	gtatcatatg	ccaagtacgc	360
cccctattga	cgtcaatgac	ggtaaattgg	ccgcctggca	ttatgcccag	tacatgacct	420
tatgggactt	tcctacttgg	cagtacatct	acgtattagt	catcgctatt	accatggtga	480
tgcggttttg	gcagtacatc	aatgggcgtg	gatagcggtt	tgactcacgg	ggatttccaa	540
gtctccacc	cattgacgtc	aatgggagtt	tgttttggca	ccaaaatcaa	cgggactttc	600
caaaatgtcg	taacaactcc	gccccattga	cgcaaattgg	cggtaggcgt	gtacgggtgg	660
aggtctatat	aagcagagct	cgtttagtga	accgtcagat	cgctggaga	cgccatccac	720

ES 2 426 089 T3

gctgttttga cctccataga agacaccggg accgatccag cctccggtcg accgatcctg 780  
agaacttcag ggtgagtttg gggacccttg attgttcttt ctttttcgct attgtaaaat 840  
tcatgttata tggagggggc aaagttttca ggggtgtggt tagaatggga agatgtccct 900  
tgtatcacca tggaccctca tgataathtt gtttctttca ctttctactc tgttgacaac 960  
cattgtctcc tcttattttc ttttcatttt ctgtaacttt ttcgttaaac tttagcttgc 1020  
atgtgtaacg aatttttaaa ttcacttttg tttatgtgct agattgtaag tactttctct 1080  
aatcactttt ttttcaaggc aatcagggta tattatattg tacttcagca cagttttaga 1140  
gaacaattgt tataattaaa tgataaggta gaatatttct gcatataaat tctggtctgc 1200  
gtggaaatat tcttattggt agaaacaact acaccctggt catcatcctg cttttctctt 1260  
tatggttaca atgatataca ctgtttgaga tgaggataaa atactctgag tccaaaccgg 1320  
gccctctgct taaccatggt catgccttct tctctttcct acagctcctg ggcaacgtgc 1380  
tgggtgtgtg gctgtctcat ctttttgcca aagaattcct cgacggatcc ctcgaggaat 1440  
tctgacacta tgaagtgcct tttgtactta gcotttttat tcattggggg gaattgcaag 1500  
ttcaccatag tttttccaca caaccaaaaa ggaaactgga aaaatgttcc ttctaattac 1560  
cattattgcc cgtcaagctc agatttaaat tggcataatg acttaatagg cacagcctta 1620  
caagtcaaaa tgcccaagag tcacaaggct attcaagcag acggttggat gtgtcatgct 1680  
tccaaatggg tccactactg tgatttccgc tggatggac cgaagtatat aacacattcc 1740  
atccgatcct tccactccatc tgtagaacaa tgcaaggaaa gcattgaaca aacgaaacaa 1800  
ggaacttggc tgaatccagg ctccctcctc caaagttgtg gatatgcaac tgtgacggat 1860  
gccgaagcag tgattgtcca ggtgactcct caccatgtgc tggttgatga atacacagga 1920  
gaatgggttg attcacagtt catcaacgga aatgcagca attacatatg ccccactgct 1980  
cataactcta caacctggca ttctgactat aagggtcaaag ggctatgtga ttctaacctc 2040  
atttccatgg acatcacctt cttctcagag gacggagagc tatcatcctt gggaaaggag 2100  
ggcacagggg tcagaagtaa ctactttgct tatgaaactg gaggcaaggc ctgcaaaatg 2160  
caactactgca agcattgggg agtcagactc ccatcagggtg tctggttcga gatggctgat 2220  
aaggatctct ttgctgcagc cagattccct gaatgccag aagggtcaag tatctctgct 2280  
ccatctcaga cctcagtgga tgtaagtcta attcaggacg ttgagaggat cttggattat 2340  
tccctctgcc aagaaacctg gagcaaaatc agagcgggtc ttccaatctc tccagtggat 2400  
ctcagctatc ttgctcctaa aaaccagga accggctcctg ctttcacat aatcaatggg 2460  
accctaaaat actttgagac cagatacatc agagtcgata ttgctgctcc aatcctctca 2520

ES 2 426 089 T3

agaatggtcg gaatgatcag tggaaactacc acagaaaggg aactgtggga tgactgggca 2580  
 ccatatgaag acgtggaaat tggaccaat ggagttctga ggaccagttc aggatataag 2640  
 tttcctttat acatgattgg acatggatg ttggactccg atcttcatct tagctcaaag 2700  
 gctcaggtgt tcgaacatcc tcacattcaa gacgctgctt cgcaacttcc tgatgatgag 2760  
 agtttatttt ttggtgatac tgggctatcc aaaaatccaa tcgagcttgt agaaggttgg 2820  
 ttcagtagtt ggaaaagctc tattgcctct tttttcttta tcatagggtt aatcattgga 2880  
 ctattcttgg ttctccgagt tggatccat ctttgcatta aattaaagca caccaagaaa 2940  
 agacagattt atacagacat agagatgaac cgacttggaa agtaactcaa atcctgcaca 3000  
 acagattctt catgtttgga ccaaatcaac ttgtgatacc atgctcaaag aggctcaat 3060  
 tataattgag tttttaattt ttatgaaaaa aaaaaaaaaa aacggaattc ctcgagggat 3120  
 ccgtcgagga attcactcct caggtgcagg ctgcctatca gaaggtggtg gctggtgtgg 3180  
 ccaatgcctt ggctcacaaa taccactgag atctttttcc ctctgccaaa aattatgggg 3240  
 acatcatgaa gcccttgag catctgactt ctggctaata aaggaaattt attttcattg 3300  
 caatagtgtg ttggaatttt ttgtgtctct cactcggaag gacatatggg agggcaaatc 3360  
 atttaaaaca tcagaatgag tatttggttt agagtttggc aacatatgcc catatgctgg 3420  
 ctgccatgaa caaagggttg ctataaagag gtcactcagta tatgaaacag cccctgctg 3480  
 tccattcctt attccataga aaagccttga cttgaggtta gatttttttt atattttggt 3540  
 ttgtgttatt tttttcttta acatccctaa aattttcctt acatgtttta ctagccagat 3600  
 ttttcctcct ctctgacta ctcccagtca tagctgtccc tcttctctta tggagatccc 3660  
 tcgacggatc ggccgcaatt cgtaatcatg tcatagctgt ttctgtgtg aaattgttat 3720  
 ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc 3780  
 taatgagtga gctaaactac attaatgag ttgcgctcac tgcccgttt ccagtcggga 3840  
 aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt 3900  
 attgggcgct ctcccgcttc ctgcctcact gactcgctgc gctcggctgt tcggctgcgg 3960  
 cgagcggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac 4020  
 gcaggaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg 4080  
 ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca 4140  
 agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc 4200  
 tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc 4260  
 ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag 4320  
 gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc 4380

ES 2 426 089 T3

ttatccggta actatcgtct tgagtccaac cgggtaagac acgacttata gccactggca 4440  
 gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg 4500  
 aagtggggtg ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggatatctg cgctctgctg 4560  
 aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaaa aaccaccgct 4620  
 ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa 4680  
 gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa 4740  
 gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa 4800  
 tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gaggtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc 4860  
 ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcoctga 4920  
 ctccccgtcg tntagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgtgca 4980  
 atgataccgc gagaccacg ctcaaccgct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc 5040  
 ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca gtctattaat 5100  
 tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttggtgcc 5160  
 attgctacag gcacgtggt gtcacgctcg tcgtttggtg tggttcatt cagctccggt 5220  
 tccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatggtgt gcaaaaaagc gggttagctc 5280  
 cttcggtcct ccgatcgttg tcagaagtaa gttggccgca gtgttatcac tcatggttat 5340  
 ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg 5400  
 tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgagg cgaccgagtt gctcttgccc 5460  
 ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg 5520  
 aaaaagttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat 5580  
 gtaaccact cgtgcacca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg 5640  
 gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaagggg ataagggcga cacggaaatg 5700  
 ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct 5760  
 catgagcggg tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac 5820  
 atttccccga aaagtgccac ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaa attcgcgtta 5880  
 aatttttggt aatcagctc attttttaac caataggccg aaatcgcaa aatcccttat 5940  
 aatcaaaaag aatagaccga gataggggtg agtgttggtc cagtttgga caagagtcca 6000  
 ctattaaaga acgtggactc caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc 6060  
 ccactacgtg aaccatcacc ctaatcaagt tttttggggt cgaggtgccg taaagcacta 6120  
 aatcggaacc ctaaagggag cccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg 6180

ES 2 426 089 T3

```
gcgagaaagg aaggggaagaa agcgaaagga gcgggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg 6240
gtcacgctgc gcgtaaccac cacacccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgcgctcc 6300
cattcgccat tcaggctgcg caactgttgg gaagggcgat cggcgcgggc ctcttcgcta 6360
ttacgccagc tggcgaaagg gggatgtgct gcaagggcat taagttgggt aacgccaggg 6420
ttttcccagt caccgcttg taaaacgacg gccagtgagc gcgcgtaata cgactcacta 6480
tagggcgaat tggagctcca ccgcggtg 6508
```

<210> 15  
<211> 7213  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Plásmido que codifica una fusión de TPO y HA  
10  
<400> 15

ES 2 426 089 T3

gcggccggcc gctctagaga gcttggccca ttgcatacgt tgtatccata tcataaatag 60  
 tacatttata ttggctcatg tccaacatta ccgccatggt gacattgatt attgactagt 120  
 tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcggt 180  
 acataactta cggtaaattg cccgcctggc tgaccgcca acgacccccg cccattgacg 240  
 tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaatagga ctttccattg acgtcaatgg 300  
 gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaaagt 360  
 acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct ggcatatgc ccagtacatg 420  
 accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg 480  
 gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt 540  
 ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaa tcaacgggac 600  
 tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgccccca ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg 660  
 tgggaggtct atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc agatcgctg gagacgccat 720  
 ccacgctggt ttgacctcca tagaagacac cgggaccgat ccagcctccg gtcgaccgat 780  
 cctgagaact tcagggtgag tttggggacc cttgattggt ctttcttttt cgctattgta 840  
 aaattcatgt tatatggagg gggcaaagtt ttcaggggtg tgtttagaat ggggaagatgt 900  
 cccttgatc accatggacc ctcatgataa ttttgtttct ttcactttct actctgttga 960  
 caaccattgt ctctcttat tttcttttca ttttctgtaa ctttttcggt aaactttagc 1020  
 ttgcatttgt aacgaatfff taaattcact tttgtttatt tgtcagattg taagtacttt 1080  
 ctctaatac ttttttttca aggcaatcag ggtatattat attgtacttc agcacagttt 1140  
 tagagaacaa ttgttataat taaatgataa ggtagaatat ttctgcatat aaattctggc 1200

ES 2 426 089 T3

tggcgtggaa atattcttat tggtagaaac aactacacce tggatcatcat cctgcctttc 1260  
 tctttatggg tacaatgata tacactgttt gagatgagga taaaatactc tgagtccaaa 1320  
 ccgggcccct ctgctaacca tgttcatgcc ttcttctctt tctacagct cctgggcaac 1380  
 gtgctggttg ttgtgctgtc tcatcatttt ggcaaagaat tctagactga catggcgcgt 1440  
 tcaacgctct caaaaccct taaaaataag gttaaccgc gaggcccct aatcccctta 1500  
 attcttctga tgctcagagg ggtcagtact gcttcgcccg gctccagtgc ggcccagccg 1560  
 gccagcccgg ctctctctgc ttgtgacctc cgagtcctca gtaaactgct tctgtactcc 1620  
 catgtccttc acagcagact gagccagtgc ccagaggttc accctttgcc tacacctgtc 1680  
 ctgctgcctg ctgtggactt tagcttggga gaatggaaaa ccagatgga ggagaccaag 1740  
 gcacaggaca ttctgggagc agtgaccctt ctgctggagg gagtgatggc agcacgggga 1800  
 caactgggac ccacttgctt ctcatcctc ctggggcagc tttctggaca ggtccgtctc 1860  
 ctcttgggg ccctgcagag cctccttggga acccagcttc ctccacaggg caggaccaca 1920  
 gctcacaagg atcccaatgc catcttctg agcttccaac acctgctccg aggaaagggtg 1980  
 cgtttctga tgctttagg agggccacc ctctgctca ggcgggcccc acccaccaca 2040  
 gctgtccca gcagaacctc tctagtcctc aactggcgg ccgcaatcga gggaaggcaa 2100  
 gacctccag gaaatgaca cagcgacaaa atttgtcttg gacatcatgc tgtatcaaat 2160  
 ggcaccaaag taaacacact cactgagaga ggagtagaag ttgtcaatgc aacggaaaca 2220  
 gtggagcggg caaacatccc caaaatttgc taaaaggga aaagaaccac tgatcttggc 2280  
 caatgcgac tgtagggac cattaccgga ccacctcaat gcgaccaatt tctagaattt 2340  
 tcagctgatc taataatcga gagacgagaa ggaaatgat tttgttacc ggggaagttt 2400  
 gttaatgaag aggcattgcy acaaactctc agaggatcag gtgggattga caaagaaaca 2460  
 atgggattca catatagtgg aataaggacc aacggaaca ctagtgcctg tagaagatca 2520  
 gggcttcat tctatgcaga aatggagtgg ctctgtcaa atacagaca tgcttctttc 2580  
 ccacaaatga caaatcata caaaaacaca aggagagaat cagctctgat agtatgggga 2640  
 atccaccatt caggatcaac caccgaacag accaaactat atgggagtgg aaataaactg 2700  
 ataacagtcg ggagttccaa atatcatcaa tcttttgtgc cgagtccagg aacacgaccg 2760  
 cagataaatg gccagtccgg acggattgat tttoattggg tgatcttggga tcccaatgat 2820  
 acagttactt ttagtttcaa tggggctttc atagctcaa atcgtgccag cttcttgagg 2880  
 ggaaagtcca tggggatcca gagcgtgtg caggttgatg ccaattgcga aggggaatgc 2940  
 taccacagtg gagggactat aacaagcaga ttgccttttc aaaacatcaa tagcagagca 3000

ES 2 426 089 T3

gttggcaaat gcccaagata tgtaaaacag gaaagtttat tattggcaac tgggatgaag 3060  
 aacgttcccg aaccttccaa aaaaaggaaa aaaagaggcc tgtttggcgc tatagcaggg 3120  
 tttattgaaa atggttggga aggtctggtc gacgggtggt acggtttcag gcatcagaat 3180  
 gcacaaggag aaggaactgc agcagactac aaaagcacc aatcggcaat tgatcagata 3240  
 accggaagt taaatagact cattgagaaa accaaccagc aatttgagct aatagataat 3300  
 gaattcactg aggtggaaaa gcagattggc aatttaatta actggacca agactccatc 3360  
 acagaagtat ggtcttacia tgctgaactt attgtggcaa tggaaaacca gcacactatt 3420  
 gatttggctg attcagagat gaacaggctg tatgagcag tgaggaaaca attaagggaa 3480  
 aatgctgaag aggatggtac tggttgcttt gaaatttttc ataaatgtga cgatgattgt 3540  
 atggctagta taaggaacaa tacttatgat cacagcaaat acagagaaga agcgatgcaa 3600  
 aatagaatac aaattgacc agtcaaattg agtagtggt acaaagatgt gatactttgg 3660  
 tttagcttcg gggcatcatg ctttttgctt cttgccattg caatgggcct tgttttcata 3720  
 tgtgtgaaga acggaacat gcggtgcact atttgtatat aagtttgaa aaaaacacc 3780  
 ttgtttctac tctctagagg atccccggc gcgaacgtgg aagatccgtc gaggaattca 3840  
 ctctcaggt gcaggctgcc tatcagaagg tgggtggctgg tgtggccaat gccctggctc 3900  
 acaataacca ctgagatott tttccctctg ccaaaaatta tggggacatc atgaagcccc 3960  
 ttgagcatct gacttctggc taataaagga aatttatatt cattgcaata gtgtgttgg 4020  
 attttttggt tctctcactc ggaaggacat atgggagggc aatcattta aaacatcaga 4080  
 atgagtattt ggtttagagt ttggcaacat atgccatat gctggctgcc atgaacaaag 4140  
 gttggctata aagaggtcat cagtatatga aacagcccc tgctgtccat tccttatcc 4200  
 atagaaaagc cttgacttga ggttagattt tttttatatt ttgttttggt ttattttttt 4260  
 ctttaacatc cctaaaattt tccttacatg ttttactagc cagatttttc ctctctctc 4320  
 gactactccc agtcatagct gtccctctc tcttatggag atccctcgac ggatcggcog 4380  
 caattcgtaa tcatgtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca 4440  
 cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaag agtgagctaa 4500  
 ctacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag 4560  
 ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg gcgctcttc 4620  
 gcttctctgc tcaactgact gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 4680  
 cactcaaagg cggtaatagc gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 4740  
 tgagcaaaag gccagcaaaa gccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc 4800  
 cataggtccc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 4860

ES 2 426 089 T3

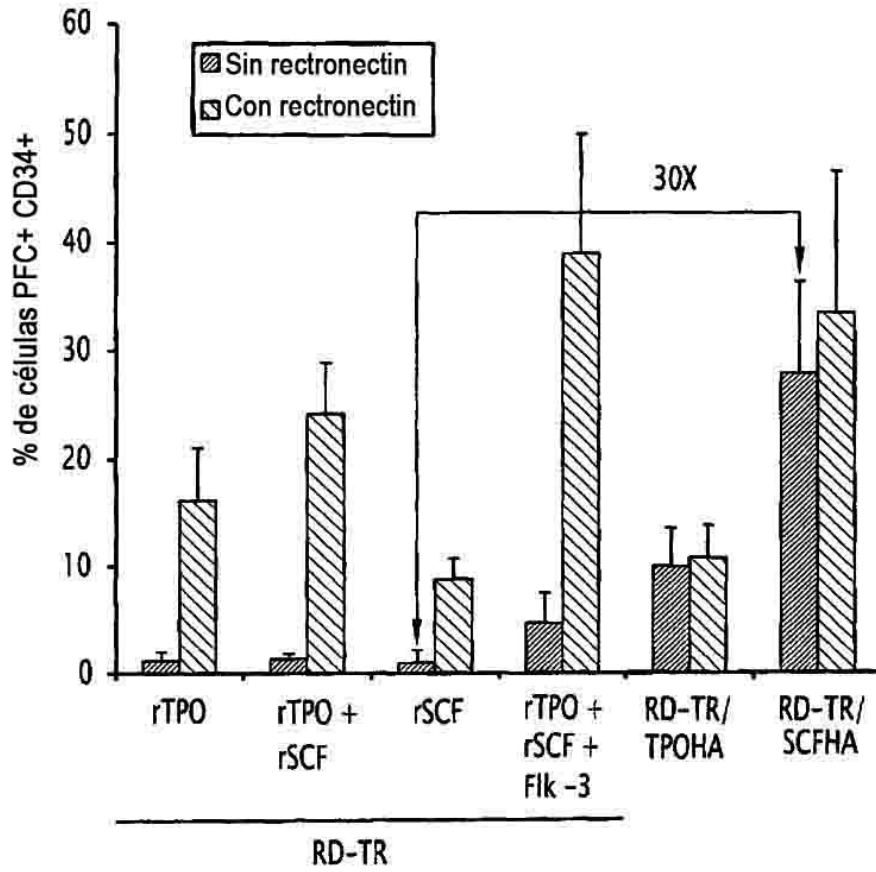
aaccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct 4920  
cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc ggggaagcgtg 4980  
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag 5040  
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttata cggtaaactat 5100  
cgtcttgagt ccaaccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 5160  
aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 5220  
tacggctaca ctagaagaac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 5280  
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggtttt 5340  
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 5400  
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gtaagggat tttggtcatg 5460  
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatac 5520  
atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca 5580  
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag 5640  
ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac 5700  
ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc 5760  
agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattggtg ccgggaagct 5820  
agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacggtg ttgccattgc tacaggcatc 5880  
gtgggtgtcac gctcgtcgtt tgggatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg 5940  
cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcggggt agctccttcg gtccctccgat 6000  
cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtggt atcactcatg gttatggcag cactgcataa 6060  
ttctcttact gtcattgcat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa 6120  
gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc gagttgctct tgcccggcgt caatacggga 6180  
taataccgcg ccacatagca gaactttaa agtgctcacc attggaaaac gttcttcggg 6240  
gcgaaaactc tcaaggatct taccgctggt gagatccagt tcgatgtaac ccaactcgtgc 6300  
acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg 6360  
aaggcaaaat gccgcaaaaa aggaataag ggcgacacgg aaatggtgaa tactcatact 6420  
cttcttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga gcggatacat 6480  
atltgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt 6540  
gccacctaaa ttgtaagcgt taatattttg ttaaaattcg cgttaaattt ttgttaaatc 6600  
agctcatttt ttaaccaata ggccgaaatc ggcaaaatcc cttataaatc aaaagaatag 6660

ES 2 426 089 T3

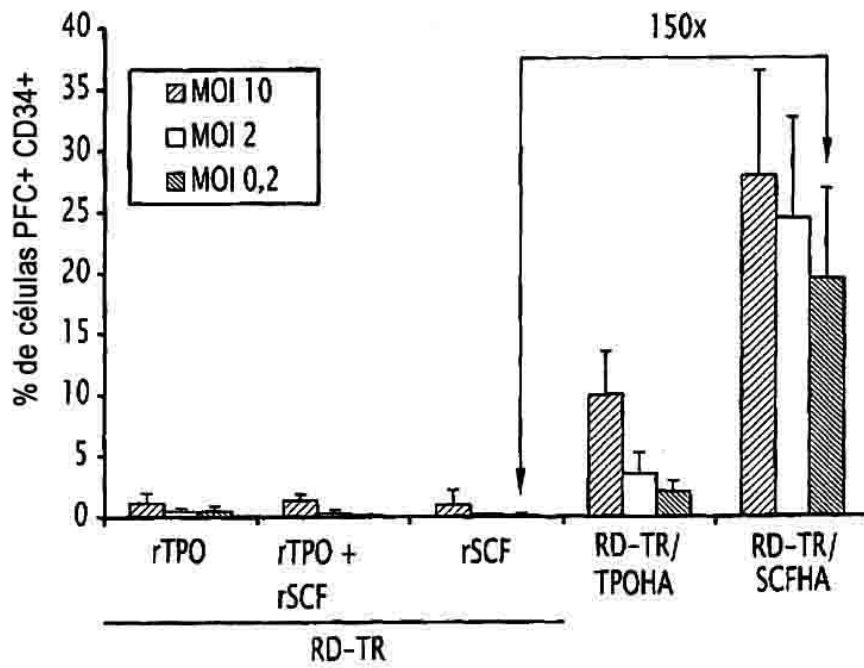
accgagatag	ggttgagtgt	tgttccagtt	tggaacaaga	gtccactatt	aaagaacgtg	6720
gactccaacg	tcaaagggcg	aaaaaccgtc	tatcagggcg	atggcccact	acgtgaacca	6780
tcaccctaata	caagtttttt	ggggtcgagg	tgccgtaaag	cactaaatcg	gaaccctaaa	6840
gggagcccc	gatttagagc	ttgacgggga	aagccggcga	acgtggcgag	aaaggaaggg	6900
aagaaagcga	aaggagcggg	cgctagggcg	ctggcaagtg	tagcggtcac	gctgcgcgta	6960
accaccacac	cgcccgcgct	taatgcgcgc	ctacagggcg	cgtcccattc	gccattcagg	7020
ctgcgcaact	gttggaagg	gcgatcgggtg	cgggcctctt	cgctattaacg	ccagctggcg	7080
aaagggggat	gtgctgcaag	gcgattaagt	tgggtaacgc	cagggttttc	ccagtcacga	7140
cgttgtaaaa	cgacggccag	tgagcgcgcg	taatacgact	cactataggg	cgaattggag	7200
ctccaccgcg	gtg					7213

**REIVINDICACIONES**

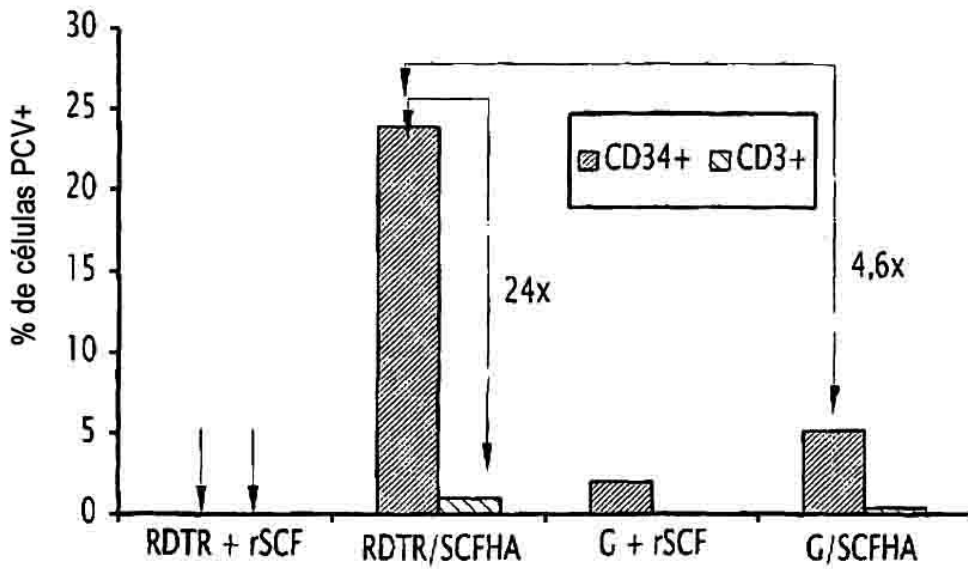
1. Una partícula de vector lentivírico para transferir uno o más ácidos nucleicos a células CD34+, en la que dicha partícula de vector comprende al menos:
- 5
- una primera proteína que comprende una fusión de los dominios transmembrana y extracelular de la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 endógeno felino y el dominio citoplásmico de la glicoproteína de la envoltura A del virus de la leucemia murina, y
- 10 - una segunda proteína que comprende un ligando del receptor de c-Kit, siendo dicho ligando del receptor de c-Kit la citocina del factor citoblástico (SCF).
- en el que la partícula de vector no comprende la glicoproteína de la envoltura G del virus de la estomatitis vesicular (VSV).
- 15
2. La partícula de vector de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la primera proteína consiste en una fusión de los dominios transmembrana y extracelular de la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 endógeno felino y el dominio citoplásmico de la glicoproteína de la envoltura A del virus de la leucemia murina.
- 20 3. La partícula de vector lentivírico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la segunda proteína comprende o consiste en una fusión de una citocina del SCF e (i) el dominio del extremo N de una glicoproteína hemaglutinina, o (ii) una glicoproteína de envoltura retrovírica.
4. El uso de (i) un primer ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una primera proteína tal como se define en la reivindicación 1 o 2, y de (ii) un segundo ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una segunda proteína como en cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3, para preparar una partícula de vector lentivírico para transferir uno o más ácidos nucleicos a células CD34+.
- 25
5. Un medicamento que comprende una partícula de vector lentivírico tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como principio activo.
- 30
6. El uso de una partícula de vector lentivírico tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para transferir uno o más ácidos nucleicos a células CD34+ *ex vivo*.
- 35 7. Un procedimiento para preparar células CD34+ previsto para tratar un individuo, en el que las células CD34+ que se van a administrar al individuo se ponen en contacto *in vitro* con una partícula de vector lentivírico tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las células se transducen por uno o más ácidos nucleicos transferidos a partir de la partícula de vector lentivírico.



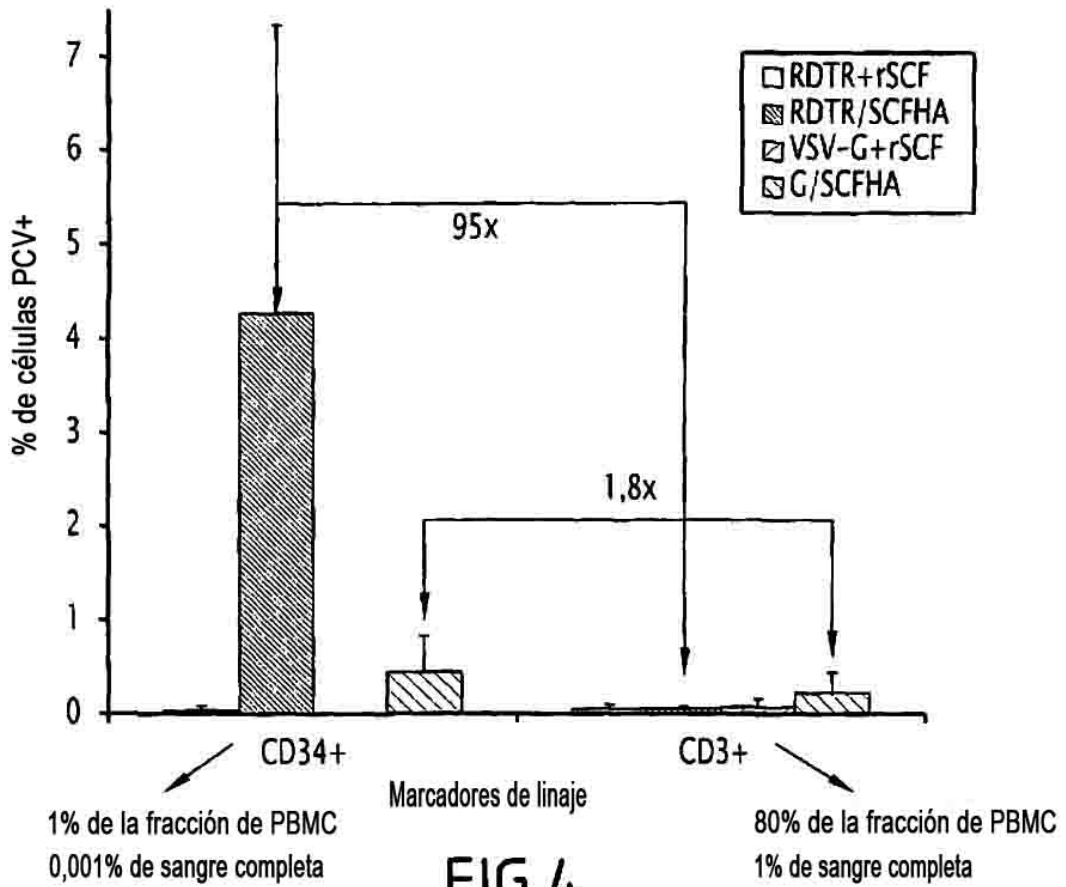
**FIG.1**



**FIG.2**



**FIG. 3**



**FIG. 4**

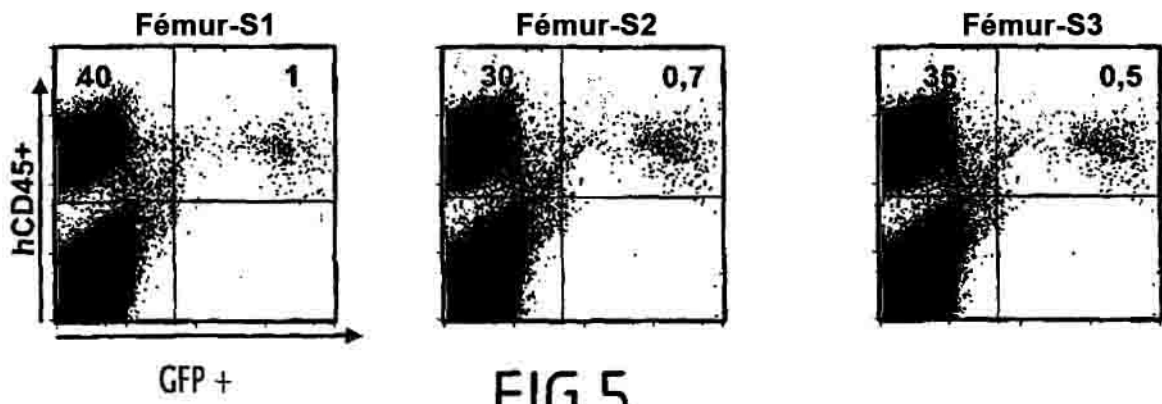


FIG.5

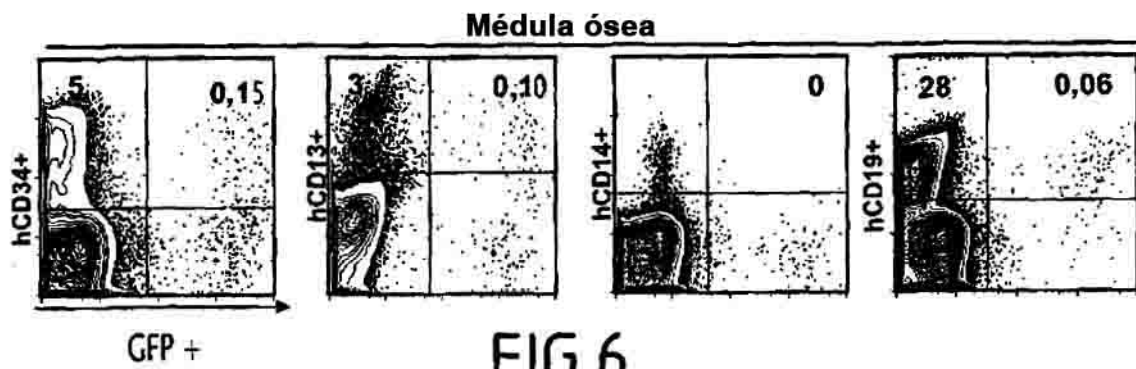


FIG.6

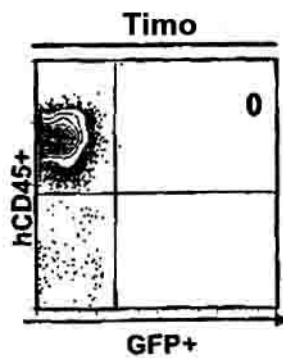


FIG.7

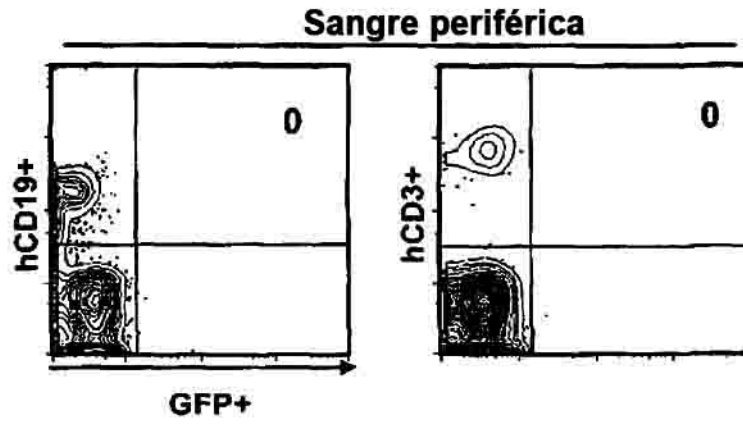


FIG.8

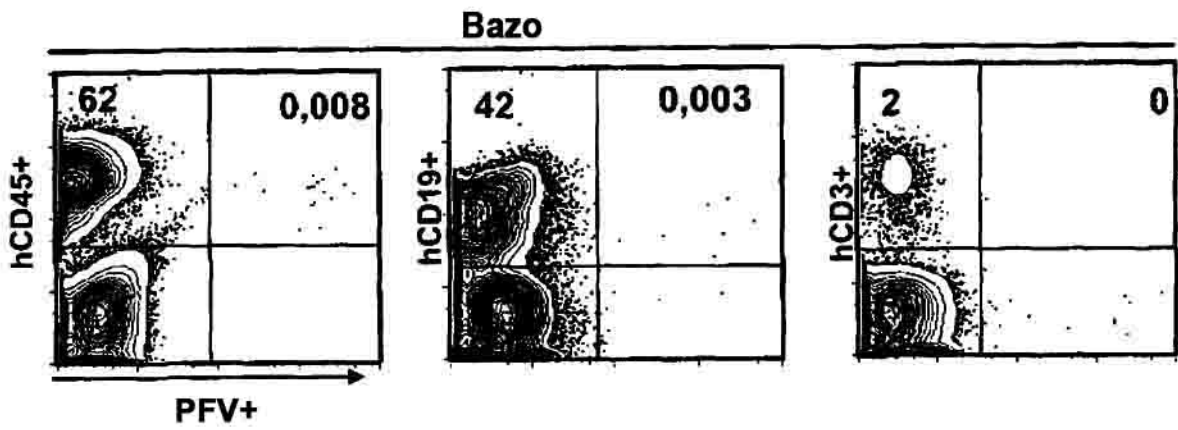


FIG.9