



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 202**

51 Int. Cl.:  
**C12N 7/02** (2006.01)  
**C12N 15/86** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02763613 .3**  
96 Fecha de presentación : **06.09.2002**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1432791**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2004**

54 Título: **Sistemas vectores basados en replicones de alfavirus.**

30 Prioridad: **06.09.2001 US 317722 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**07.12.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**07.12.2009**

73 Titular/es: **Alphavax, Inc.**  
**P.O. Box 110307, 2 Triangle Drive**  
**Research Triangle Park**  
**North Carolina 27709-0307, US**

72 Inventor/es: **Smith, Jonathan, F.;**  
**Kamrud, Kurt, I.;**  
**Rayner, Jonathan, O.;**  
**Dryga, Sergey, A. y**  
**Caley, Ian, J.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 330 202 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

Sistemas vectores basados en replicones de alfavirus.

5 **Campo de la invención**

La presente invención está dirigida a métodos y a construcciones mejoradas para preparar partículas alfavirus recombinantes que son útiles en inmunoterapias para el cáncer y enfermedades infecciosas y en el suministro de genes con propósitos terapéuticos.

10 **Antecedentes de la invención**

En la actualidad, los alfavirus se usan como plataforma vectorial para desarrollar vacunas para enfermedades infecciosas (por ejemplo, véase las patentes estadounidenses Nos. 5.792.462, 6.156.558, 5.811.407, 5.789.245, 6.015.694, 5.739.026, Pushko *et al.*, *Virology* 239 (2): 389-401 (1997), Frolov *et al.*, *J. Virol.* 71(1): 248-258 (1997); Smerdou and Liljestrom, *J. Virol.* 73(2): 1092-1098 (1999). Los alfavirus comprenden un género en la familia *Togaviridae*, y los miembros del género se encuentran a lo largo de toda la Tierra, tanto en huéspedes vertebrados como en invertebrados. Entre los alfavirus más estudiados para plataformas vectoriales se encuentran el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), el virus de la selva de Semliki (SFV) y el virus Sindbis, el miembro prototipo del género. Se han desarrollado varias construcciones para mejorar la inmunogenicidad y efectividad en aplicaciones de vacunas. Muchas de estas construcciones han sido diseñadas también para reducir la probabilidad de formación de virus con capacidad de replicación mediante recombinación. Johnston *et al.* (patentes estadounidenses Nos. 5.792.462 y 6.156.558, citadas anteriormente), reconocieron el potencial para la recombinación partiendo de un sistema auxiliar único (en el que el conjunto completo de proteínas estructurales de un alfavirus están en una molécula de ARN y las proteínas no estructurales y el gen de interés están en otra molécula), y de esta manera diseñó sistemas "doble auxiliar" que utilizaban dos ARN auxiliares para codificar las proteínas estructurales. Dubensky *et al.* (patente estadounidense No. 5.789.245) y Polo *et al.* (patente estadounidense No. 6.242.259) describen el uso de dos cartuchos de expresión de ADN de proteínas estructurales de alfavirus para empaquetar replicones de alfavirus u otros vectores de alfavirus. Liljestrom y colaboradores han presentado datos que confirman que un "sistema auxiliar único" generará partículas víricas de tipo salvaje mediante recombinación (Bergland, *et al.* 1993 *Biotechnology* 11(8): 916-920)).

Distribuyendo los genes víricos entre tres ácidos nucleicos, dos de los cuales comprenden el sistema auxiliar, tal como en la técnica descrita anteriormente, la frecuencia de recombinación teórica de creación de un virus con capacidad de replicación se reduce considerablemente respecto a los sistemas de auxiliar único. Estos sistemas existentes incluyen el uso de las señales de reconocimiento de la ARN polimerasa de alfavirus, de manera que los sistemas auxiliares pueden aprovecharse de la presencia de la maquinaria de replicación del alfavirus para la amplificación y expresión eficiente de las funciones auxiliares. Sin embargo, la presencia de las señales de reconocimiento de terminación en los ARN auxiliares significa también que los recombinantes en los que las construcciones auxiliares se incorporan al final del ARN replicón mediante recombinación de ARN permanecen replicables. Se reconoce también (por ejemplo, Liljestrom *et al.* patente estadounidense No. 6.190.666, columna 17, líneas 45-48) que la región de unión a cápside de nsP1 es necesaria para el empaquetamiento del ARN alfavírico en un virus o una partícula de tipo vírica, y de esta manera la retirada de esta región resultaría en la reducción del empaquetamiento (véase también Levis *et al.* 1986 *Cell* 44:137 y Weiss *et al.* 1989 *J. Virol.* 63:530).

De esta manera, en los sistemas replicón existentes, las señales de empaquetamiento conocidas se incluyen típicamente en los ARN replicones y se excluyen de las construcciones auxiliares. Sin embargo, aún así los ARN auxiliares son empaquetados o coempaquetados a una frecuencia inferior (Lu and Silver (*J. Virol Methods* 2001, 91(1): 59-65)), y las construcciones auxiliares con señales de reconocimiento terminales serán amplificadas y expresadas en presencia de un replicón, y proporcionarán potencialmente eventos de recombinación adicionales.

Las dosificaciones preferentes actuales para la administración de partículas replicón vectoriales, tal como se describe en Johnston *et al.*, o partículas alfavirus recombinantes, tal como se describe en Dubensky *et al.*, son aproximadamente de  $10^6$  a  $10^8$  partículas. En el caso de administraciones a chimpancés, Dubensky *et al.* han estimado la necesidad de 4 inyecciones, conteniendo cada una  $10^7$ - $10^8$  partículas, con una vacuna Sindbis-HBV. Dichas dosificaciones requieren procedimientos de fabricación a gran escala, y las cantidades producidas a dicha escala pueden ser mayores que la frecuencia predicha para la generación de virus con capacidad de replicación en estos sistemas existentes.

De esta manera, permanece una necesidad de mejorar adicionalmente los sistemas para preparar partículas replicón de alfavirus para reducir adicionalmente la frecuencia predicha de formación de virus con capacidad de replicación, y para optimizar los costos y las estrategias de preparación.

**Sumario de la invención**

La presente invención proporciona sistemas vectores basados en replicón de alfavirus mejorados para producir partículas replicón de alfavirus infecciosas, sin capacidad de replicación en células permisivas a alfavirus. Están incluidos en el alcance de la invención los ARN replicones mejorados y los ácidos nucleicos auxiliares mejorados para expresar las proteínas estructurales de alfavirus. Durante la producción de partículas alfavirus recombinantes, la generación de

partículas víricas con capacidad de replicación puede ocurrir mediante solo recombinación o mediante una combinación de empaquetamiento y recombinación de auxiliar. De esta manera, se proporcionan construcciones que eliminan o minimizan la ocurrencia de uno o de ambos de estos eventos. Además, estas construcciones están diseñadas también para minimizar los costos y la complejidad de fabricación de las partículas preparadas con dichas construcciones. La invención proporciona también métodos para preparar partículas alfavirus recombinantes usando las construcciones reivindicadas, y composiciones farmacéuticas que comprenden estas partículas alfavirus recombinantes.

En un primer aspecto, se proporciona una molécula de ADN recombinante para expresar las proteínas estructurales de alfavirus que comprende un promotor para dirigir la transcripción de ARN a partir de una secuencia de ADN ligada operativamente a una secuencia de ADN que comprende una secuencia codificadora completa de poliproteína estructural de alfavirus, con la condición de que la secuencia de ADN no codifique las secuencias de reconocimiento de replicación 5' ó 3' alfavirales o un promotor subgenómico de alfavirus.

Un segundo aspecto de la invención proporciona métodos para producir partículas replicón de alfavirus infecciosas, sin capacidad de replicación, que comprenden introducir en una población de células (i) la molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1; y (ii) un ARN replicón de alfavirus que codifica al menos un ARN heterólogo, bajo condiciones mediante las cuales se producen partículas infecciosas sin capacidad de replicación.

En un tercer aspecto de la invención, se proporcionan métodos para producir partículas replicón de alfavirus infecciosas, sin capacidad de replicación, que comprenden introducir en un población de células uno o más ácidos nucleicos auxiliares seleccionados de entre el grupo que comprende ADN auxiliares no replicantes, tal como se ha descrito anteriormente, y un ARN replicón de alfavirus que codifica al menos un ARN heterólogo, de manera que los auxiliares expresan todas las proteínas estructurales de alfavirus, bajo condiciones mediante las cuales se producen partículas replicón de alfavirus infecciosas y sin capacidad de replicación.

Un cuarto aspecto de la presente invención proporciona células auxiliares para producir partículas alfavirus infecciosas, sin capacidad de replicación, utilizando cualquier combinación de los auxiliares divulgados en la presente memoria comprendiendo, en una célula permisiva a alfavirus, (i) una o más moléculas de ácido nucleico recombinante seleccionadas de entre el grupo que comprende ADN auxiliares no replicantes, descritos anteriormente, y (ii) un ARN replicón de alfavirus que codifica al menos un ARN heterólogo, en el que el uno o más ácidos nucleicos auxiliares recombinantes codifican, entre los mismos, todas las proteínas estructurales de alfavirus que conforman entre sí las partículas replicón de alfavirus.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

Tal como se usa en la presente memoria, el término "alfavirus" tiene su significado convencional en la técnica, e incluye diversas especies, tales como VEE, SFV, Sindbis, virus del río Ross, virus de encefalitis equina occidental, virus de encefalitis equina oriental, Chikungunya, S.A. AR86, virus Everglades, Mucambo, virus de la selva Barmah, virus Middelburg, virus Pixuna, virus O'nyong-nyon, virus Getah, virus Sagiyama, virus Bebaru, virus mayaro, virus Una, virus Aura, virus Whataroa, virus Banbanki, virus Kyzylagach, virus Highlands J, virus Fort Morgan, virus Ndumu y virus Buggy Creek. Los alfavirus preferentes usados en las construcciones y los métodos de la invención reivindicada son VEE, S.AAR86, Sindbis (por ejemplo TR339, véase la patente estadounidense No. 6.008.035) y SFV.

Las expresiones "secuencia de reconocimiento de replicación 5' de alfavirus" y "secuencia de reconocimiento de replicación 3' de alfavirus" se refieren a las secuencias que se encuentran en los alfavirus, o secuencias derivadas de los mismos, que son reconocidas por las proteínas replicasa de alfavirus no estructurales y llevan a la replicación de ARN vírico. A veces, estas secuencias se denominan como extremos 5' y 3', o secuencias 5' y 3' de alfavirus. En las construcciones de la presente invención, el uso de estos extremos 5' y 3' resultará en la replicación de la secuencia de ARN codificada entre los dos extremos. Estas secuencias pueden ser modificadas mediante técnicas estándar de biología molecular para minimizar adicionalmente el potencial de recombinación o para introducir sitios de clonación, con la condición de que todavía deben ser reconocidos por la maquinaria de replicación del alfavirus.

La expresión "secuencia de reconocimiento de replicación 5' de alfavirus mínima" se refiere a la secuencia mínima que permite el reconocimiento por las proteínas no estructurales del alfavirus pero no resulta en un empaquetamiento/recombinación considerable de moléculas ARN que contienen la secuencia. En una realización preferente, la secuencia de reconocimiento de replicación 5' de alfavirus mínima resulta en una reducción, en un factor de entre 50 y 100, en la frecuencia observada de empaquetamiento/recombinación del ARN que contiene dicha secuencia. El empaquetamiento/recombinación de auxiliares puede ser valorado mediante varios métodos, por ejemplo, el método descrito por Lu y Silver (J. Virol Methods 2001, 91(1): 59-65).

Los términos "replicón ARN de alfavirus", "ARN replicón de alfavirus" y "replicón ARN vector de alfavirus" se usan de manera intercambiable para hacer referencia a una molécula de ARN que expresa genes de proteínas no estructurales de manera que puede dirigir su propia replicación (amplificación) y comprende, como mínimo, las secuencias de reconocimiento de replicación 5' y 3' de alfavirus, secuencias codificadoras para proteínas no estructurales de alfavirus y un tracto de poliadenilación. Puede contener además un promotor o un IRES. También puede ser modificado artificialmente para expresar proteínas estructurales de alfavirus. Johnston *et al.* y Polo *et al.* (citados en los

antecedentes) describen numerosas construcciones para dichos replicones ARN de alfavirus, y dichas construcciones se incorporan a la presente memoria mediante referencia. Realizaciones específicas de los replicones ARN de alfavirus utilizados en la invención reivindicada pueden contener una o más mutaciones atenuantes, siendo una mutación atenuante una eliminación de un nucleótido, una adición de un nucleótido o una sustitución de uno o más nucleótidos, o una mutación que comprende una redistribución o construcción quimérica que resulta en una pérdida de virulencia en un virus vivo que contiene la mutación en comparación con el alfavirus de tipo salvaje apropiado. Ejemplos de una sustitución de nucleótido atenuante (resultando en un cambio de aminoácidos en el replicón) incluyen una mutación en el aminoácido en la posición 538 de nsP1, aminoácido en la posición 96 de nsP2 o aminoácido en la posición 372 de nsP2 en el alfavirus S.A.AR86.

Los términos “proteína/proteínas estructurales de alfavirus” se refieren a una o a una combinación de las proteínas estructurales codificadas por alfavirus. Estas son producidas por los virus como una poliproteína y están representadas generalmente en la literatura como C-E3-E2-6k-E1. E3 y 6k sirven como señales de translocación/transporte de membrana para las dos glicoproteínas, E2 y E1. De esta manera, el uso del término E1 en la presente memoria puede hacer referencia a E1, E3-E1, 6k-E1 o E3-6k-E1 y el uso del término E2 en la presente memoria puede hacer referencia a E2, E3-E2, 6k-E2 o E3-6k-E2.

El término “auxiliar(es)” se refiere a una molécula de ácido nucleico que es capaz de expresar una o más proteínas estructurales de alfavirus.

Los términos “células auxiliares” y “células empaquetadoras” se usan de manera intercambiable en la presente memoria y se refieren a la célula en la que se producen partículas replicón de alfavirus. La célula auxiliar comprende un conjunto de auxiliares que codifican una o más proteínas estructurales de alfavirus. Tal como se divulga en la presente memoria, los auxiliares pueden ser ARN o ADN. La célula puede ser cualquier célula permisiva a alfavirus, es decir, células que son capaces de producir partículas de alfavirus tras la introducción de una transcripción de ARN vírico. Las células permisivas a alfavirus incluyen, pero no se limitan a, células Vero, de riñón de cría de hámster (NHK), 293, 293T, fibroblasto de embrión de pollo (CEF) y de ovario de hámster chino (CHO). En ciertas realizaciones de la invención reivindicada, la célula auxiliar o empaquetadora puede incluir además una ARN polimerasa dependiente de ARN heterólogo y/o una proteasa específica de secuencia.

Los términos “partículas replicón de alfavirus” “partículas replicón de virus” o “partículas alfavirus recombinantes”, usadas de manera intercambiable en la presente memoria, se refieren a un complejo estructural de tipo virión que incorpora un ARN replicón de alfavirus que expresa una o más secuencias ARN heterólogas. Típicamente, el complejo estructural de tipo virión incluye una o más proteínas estructurales de alfavirus incluidas en una envoltura lipídica que encierra una nucleocápside que a su vez encierra el ARN. Típicamente, la envoltura lipídica es derivada de la membrana plasmática de la célula en la que se producen las partículas. Preferentemente, el ARN replicón de alfavirus está rodeado por una estructura nucleocápside compuesta de la proteína de cápside de alfavirus, y las glicoproteínas de alfavirus están incluidas en el envoltorio lipídico derivado de las células. Las partículas replicón de alfavirus son infecciosas pero sin capacidad de replicación, es decir, el ARN replicón no puede replicarse en la célula huésped en ausencia del ácido nucleico auxiliar o ácido nucleicos auxiliares que codifican las proteínas estructurales del alfavirus.

Tal como se describe en detalle más adelante, la presente invención proporciona sistemas replicón basados en alfavirus mejorados que reducen el potencial para la formación de virus con capacidad de replicación y que son adecuados y/o ventajosos para la fabricación a escala comercial de vacunas o agentes terapéuticos que los comprenden. La presente invención proporciona replicones ARN de alfavirus mejorados y auxiliares mejorados para expresar proteínas estructurales de alfavirus.

#### *ADN auxiliar no replicante*

En una realización de la presente invención, se divulga un ADN auxiliar que no incorpora las secuencias de reconocimiento de replicación de alfavirus que permiten la amplificación del ARN codificado entre las secuencias. Al carecer de dichas secuencias, que pueden contribuir a la frecuencia de moléculas recombinantes funcionales que pueden generarse en la célula auxiliar, un único ADN auxiliar, que codifica todas las proteínas estructurales de alfavirus necesarias para producir partículas de alfavirus recombinantes, puede minimizar el efecto que pueda tener el empaquetamiento/recombinación sobre una célula auxiliar. La reducción en empaquetamiento/recombinación detectada, en comparación con el sistema ARN bipartito, es de al menos un orden de magnitud inferior; en realizaciones preferentes, es dos, tres, o cuatro órdenes de magnitud inferior. De esta manera, otra realización de la invención reivindicada comprende un ADN recombinante para expresar proteínas estructurales de alfavirus que comprende un promotor ligado operativamente a una secuencia nucleotídica que codifica todas las proteínas estructurales de alfavirus. En una realización preferente, el promotor es un promotor de la ARN polimerasa II, tal como el promotor de CMV.

Una o más de las proteínas estructurales de alfavirus pueden codificar una o más mutaciones atenuantes, por ejemplo, tal como se define en las patentes estadounidenses Nos. 5.792.462 y 6.156.558. Las mutaciones atenuantes específicas para la glicoproteína E1 de VEE incluyen una mutación atenuante en cualquiera de los aminoácidos en las posiciones 81, 272 o 253 de E1. Las partículas replicón de alfavirus preparadas a partir del mutante VEE-3042 contienen una sustitución de isoleucina en E1-81, y las partículas replicón de virus preparadas a partir del mutante VEE-3040 contienen una mutación atenuante en E1-253. Las mutaciones atenuantes específicas para la glicoproteína E2 de VEE incluyen una mutación atenuante en cualquiera de los aminoácidos de las posiciones 76, 120 o 209 de

E2. Las partículas replicón de alfavirus preparadas a partir del mutante VEE-3014 contienen mutaciones atenuantes en E1-272 y en E2-209 (véase la patente estadounidense No 5.792.492). Una mutación atenuante específica para la glicoproteína E2 VEE incluye una mutación atenuante que comprende una eliminación de los aminoácidos 56-59 de E3. Las partículas replicón de virus preparadas a partir del mutante VEE-3526 contienen esta eliminación en E3 (aminoácidos 56-59) así como una segunda mutación atenuante en E1-253. Las mutaciones atenuantes específicas para la glicoproteína E2 de S.A.AR86 incluyen una mutación atenuante en cualquiera de los aminoácidos de las posiciones 304, 314, 372 o 376 de E2.

Se divulgan también métodos preferentes para introducir este ADN auxiliar en células permisivas a alfavirus, incluyendo el uso de lípidos catiónicos, tales como FuGene<sup>®</sup> y Lipofectamina<sup>®</sup>, electroporación o vectores víricos. La combinación del tipo de célula y el método de transfección puede ser optimizada ensayando dichas combinaciones según los métodos divulgados en la presente memoria. En realizaciones específicas, pueden usarse células 293T y Vero. En una realización preferente, el ADN auxiliar es introducido previamente a la introducción del ARN replicón, por ejemplo, treinta minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 24 o 48 horas antes de la electroporación del ARN replicón en las células. Es adecuada cualquier cantidad de tiempo que no resulte en una reducción considerable en la eficiencia de transfección del ARN replicón y que permita un empaquetamiento suficiente de VRPs por las células.

En una realización alternativa, los ADN auxiliares de la presente invención pueden ser co-electroporados en las células auxiliares con un ARN replicón de alfavirus. Los parámetros de la electroporación son ajustados partiendo de los usados para la electroporación de sólo ARN o ADN para optimizar el rendimiento de las VPRs de las células auxiliares.

#### *Métodos para preparar partículas replicón de alfavirus*

Se divulgan también métodos para preparar partículas replicón de alfavirus que expresan una o más secuencias heterólogas que utilizan los auxiliares y/o replicones ARN de alfavirus de la presente invención. Usando los métodos de la presente invención, se producen preparaciones de partículas replicón de alfavirus que no contienen partículas detectables de alfavirus con capacidad de replicación, tal como se determina mediante el paso en células permisivas a alfavirus en cultivo.

Para preparar las partículas, se seleccionan un auxiliar o una combinación de auxiliares de manera que proporcionen todas las proteínas estructurales de alfavirus necesarias para conformar una partícula infecciosa. En realizaciones preferentes, el auxiliar o la combinación de auxiliares codifican para cápside, E1 y E2. En una realización que comprende más de un auxiliar, uno de los auxiliares puede ser seleccionado de entre los auxiliares conocidos en la técnica, por ejemplo, los ARN auxiliares escindidos estándar, citados en la presente memoria. Un auxiliar o una combinación de auxiliares que comprende al menos una realización de la presente invención pueden ser usados para empaquetar cualquier ARN replicón de alfavirus. En realizaciones preferentes, el ARN replicón de alfavirus es un ARN replicón de alfavirus reconfigurado, tal como se reivindica en la presente memoria o el ARN replicón de alfavirus estándar citado en la presente memoria. En realizaciones preferentes específicas, las partículas replicón de alfavirus son partículas basadas en VEE, es decir, los auxiliares codifican proteínas estructurales del alfavirus VEE y el ARN replicón es derivado del VEE.

Las partículas replicón de alfavirus se preparan según los métodos divulgados en la presente memoria en combinación con técnicas conocidas por las personas con conocimientos en la materia. Los métodos incluyen primero introducir el auxiliar o los auxiliares seleccionados y un ARN replicón de alfavirus, que codifica uno o más ARNs heterólogos, en una población de células permisivas a alfavirus, y a continuación incubar las células bajo condiciones que permiten la producción de partículas replicón de alfavirus. La etapa de introducir el auxiliar o los auxiliares y el ARN replicón de alfavirus en la población de células auxiliares puede realizarse mediante cualquier medio adecuado, tal como se divulga en la presente memoria, o mediante otro medio conocido por las personas con conocimientos en la materia. Tal como se describe en la presente memoria, la población de células puede ser una línea celular transformada de manera estable que proporcione un promotor, una ribozima que actúa en trans, una proteasa o cualquier combinación de los mismos. Como alternativa, dichos promotores, ribozimas que actúan en trans o proteasas pueden ser añadidos a la población de células en forma de proteínas o ácidos nucleicos no replicables o replicables separadamente, según la aplicación.

Las composiciones o preparaciones de partículas replicón de alfavirus son recolectadas de la población de células auxiliares usando técnicas convencionales conocidas por las personas con conocimientos en la materia, por ejemplo, las patentes estadounidenses No. 5.492.462, 6.156.558, y estas composiciones están caracterizadas por el hecho de que no contendrán partículas detectables de alfavirus con capacidad de replicación, tal como se mide mediante el paso en células permisivas a alfavirus en cultivo.

Tal como comprenderán las personas con conocimientos en la materia, hay varias realizaciones y elementos para cada aspecto de la invención reivindicada, y en la presente memoria se anticipan todas las combinaciones de los diferentes elementos, de manera que las combinaciones específicas ejemplificadas en la presente memoria no deben considerarse como limitaciones en el alcance de la invención tal como se reivindica. Si se eliminan o añaden elementos específicos al grupo de los elementos disponibles en una combinación, entonces debe considerarse que el grupo de elementos tiene incorporado dicho cambio.

# ES 2 330 202 T3

TABLA 1

*Cebadores PCR para resolver la clonación de ADN auxiliar*

Nombre del cebador	Secuencia	Producto de amplificación
GP directa	5'CTAGCTAGCTATGTCACTAGTGACCACCATG3' (ID SEC NO: 1)	Glicoproteína de VEE
GP inversa	5' GGGCCCTCAATTATGTTTCTGGTTGGT 3' (ID SEC NO: 2)	Glicoproteína de VEE
GP-2 directa	5' GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTATAGGCGGCG CATGAGAGAAGCCCAGACCA 3' (ID SEC NO: 3)	Glicoproteína de VEE
GP2 inversa	5' GCTAGCGCTCTTCCCTTTTTTTTTTTT 3' (ID SEC NO: 4)	Glicoproteína de VEE
Cápside directa	5' GCTCTAGAATGTTCCCGTTCCAGCCAATG 3' (ID SEC NO: 5)	Cápside de VEE
Cápside inversa	5' GCGTCGACGTCTTGGCCATAGCGGCCGCGGTT ACAGACACATGGTGGTCACT 3' (ID SEC NO: 6)	Cápside de VEE
hdR directa	5' CGGGTCGGCATGGCATCTCCACCTCCTCGCGGT CCGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACGTCTGTC ACTCGGAATGGCTAAGGGAGAGCTCGC 3' (ID SEC NO: 7)	Ribozima de hepatitis delta
hdR inversa	5' TCGAGCGAGCTCTCCCTTAGCCATCCGAGTGGA	Ribozima de hepatitis delta

ES 2 330 202 T3

5		CGACGTCCTCCTTCGGATGCCAGGTCGGACC GCGAGGAGGTGGAGATGCCATGCCGACCCGGG CC 3' (ID SEC NO: 8)	
10	CMV directa	5' TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGG 3' (ID SEC NO: 9)	Promotor CMV IE
15	CMV inversa	5'TGGTCTGGGCTTCTCTCATGCGCCGCCTATAC GGTTCACTAAACCAGCTCTGC 3' (ID SEC NO: 10)	Promotor CMV IE
20	D26S directa	5'GGCGCGCCGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAG3' (ID SEC NO:11)	CMV IE + VEE 5' NCR
25	D26s inversa	5'GGCGCGCCTCCGTCAACCGCGTATACATCCTG GTAA3'(ID SEC NO: 12)	CMV IE + VEE 5' NCR
30	E3 directa	5'GGCGCGCCATGTCACTAGTGACCACCATGTG3' (ID SEC NO:13)	Genes 3-E2- 6k
35	6K inversa	5' CTCGTAGGCGCCGGCGCCTGCGG 3' (ID SEC NO: 14)	Genes 3-E2- 6k
40	EMCV directa	5'GGCGCGCCAATTCCGCCCTCTCCCTCCC3' (ID SEC NO: 15)	EMCV IRES
45	EMCV inversa	5' GGCGCGCCTTATCATCGTGTTTTTCAAAG 3' (ID SEC NO: 16)	EMCV IRES
50	EMCV- 2 directa	5' GCTAGCAATTCCGCCCTCTCCCTCCC 3 (ID SEC NO: 17)	EMCV IRES
55	EMCV- 2 inversa	5' GCTAGCTTATCATCGTGTTTTTCAAAG 3' (ID SEC NO: 18)	EMCV IRES
60			
65			

# ES 2 330 202 T3

TABLA 2

*Cebadores de PCR para la clonación de ARN auxiliar de Nodavirus*

Nombre del cebador	Secuencia	Producto de amplificación
Cápside F (Mlul)	5' CGACGCGTATGTTCCCGTTCAGCCAATG 3' (ID SEC NO: 19)	Mlul cápside VEE
Cápside R (Mlul)	5' GCACGCGTTTACAGACACATGGTGGTCACT 3' (ID SEC NO: 20)	Mlul cápside de VEE, cápside 1 de VEE, cápside 2 de VEE
Cápside F1 (Ncol)	5' CCTGCCATGGTATAAATGTTCCCGTTC AAC CAATG 3' (ID SEC NO: 21)	Cápside 1 de VEE
Cápside F2 (Ncol)	5' CCTGCCATGGCCCCGTTCCAACCAATG 3' (ID SEC NO: 22)	Cápside 2 de VEE

## Ejemplos

Los ejemplos siguientes se proporcionan para ilustrar la presente invención, y no deberían considerarse como limitativos de la misma. En estos ejemplos, nm se refiere a nanómetro, mL se refiere a mililitro, ufp/mL se refiere a unidades formadoras de placa/mililitro, nt se refiere a nucleótido(s), PBS se refiere a salina tamponada con fosfato, VEE se refiere a virus de encefalitis equina venezolana, EMC se refiere a virus de encefalomiocarditis, BHK se refiere a células renales de cría de hámster, GFP se refiere a proteína fluorescente verde, Gp se refiere a glicoproteína, CAT se refiere a cloranfenicol acetil transferasa, IFA se refiere a ensayo inmunofluorescente, e IRES se refiere a sitio interno de entrada al ribosoma. La expresión "número de aminoácido (por ejemplo, lys, thr, etc.) de E2" indica el aminoácido designado en el residuo designado del gen E2, y se usa también para hacer referencia a aminoácidos en residuos específicos en la proteína E1 y en la proteína E3.

En los ejemplos siguientes, los materiales de inicio para construir los diversos plásmidos auxiliares pueden ser seleccionados de entre cualquiera de los siguientes: clones de ADNc de longitud completa de VEE, es decir pV3000, la cepa virulenta de asno de Trinidad del VEE; o cualquiera de estos clones con mutaciones atenuantes: pV3014 (E2 lys 209, E1 thr 272), p3042 (E1 ile 81), pV3519 (E2 lys 76, E2 lys 209, E1 thr 272) y pV3526 (eliminación de E3 56-59, E1 ser 253), que están en el fondo genético de la cepa de asno de Trinidad del VEE. Tal como se describe en la patente estadounidense No. 5.792.462, estos plásmidos son digeridos con enzimas de restricción y son religados para retirar la región codificadora de proteína no estructural. Como alternativa, puede comenzarse con plásmidos auxiliares existentes, tales como los descritos en Pushko *et al.* 1997, *Ibid.* o como se describe en la presente memoria.

### Ejemplo 1

#### *Partículas replicón de VEE*

Las partículas replicón para uso como vacuna o para terapia génica pueden ser producidas usando el sistema vector basado en VEE (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.792.462). En estos Ejemplos, una o más mutaciones atenuantes (por ejemplo, Johnston y Smith, *Virology* 162(2): 437-443 (1988); Davis *et al.*, *Virology* 171 (1): 189-204 (1989); Davis *et al.*, 1990) pueden ser insertadas en la secuencia del VEE para generar partículas replicón de VEE atenuadas (Davis *et al.*, *Virology* 183 (1): 20-31 (1991); Davis *et al.*, *Virology* 212(1): 102-110 (1995); Grieder *et al.*, *Virology* 206(2): 994-1006 (1995).

## ES 2 330 202 T3

Los ejemplos de la presente memoria describen la construcción de un ARN replicón, es decir, un ARN que se auto-amplifica y expresa, y uno o más ácidos nucleicos auxiliares que codifican las proteínas estructurales para permitir el empaquetamiento. El ARN replicón porta uno o más genes extraños, por ejemplo, un gen que codifica un inmunógeno o un gen indicador. A continuación, el ARN replicón y los ácidos nucleicos auxiliares (que expresan las proteínas estructurales de alfavirus, tal como se describe más adelante) son introducidos en una célula individual, es decir, la célula auxiliar o empaquetadora, en la que el ARN replicón es empaquetado en el interior de partículas de tipo virus (denominadas en esta memoria como “partículas replicón de virus” o “VRPs”) que son infecciosas durante sólo un ciclo. Durante el único ciclo infeccioso, las características del vector basado en alfavirus resultan en muy altos niveles de expresión del ARN replicón en las células a las que va dirigido el VRP, por ejemplo, células del nodo linfático.

Los vectores vacuna resultantes son no virulentos y proporcionan protección completa contra la amenaza de virus letales en animales, incluyendo, pero no limitándose a, roedores, caballos, primates no humanos y humanos.

### 15 Ejemplo de referencia 2

#### *ARN auxiliares y replicones de VEE estándares*

Tal como se describe en la patente estadounidense No. 5.792.462, Pushko *et al.*, 1997 (Virology 239:389-401), y WO 02/03917 (Olmsted, *et al.*), un replicón de alfavirus estándar basado en VEE contiene los genes no estructurales de VEE y una única copia del promotor de ARN subgenómico 26S, seguido de un sitio de clonación múltiple. En una construcción de vacuna, uno o más genes que codifican un inmunógeno son insertados en este sitio de clonación. Con el propósito de demostrar la capacidad de los nuevos cartuchos de expresión de proteínas estructurales de la presente invención, se construyen replicones de VEE insertando el gen CAT o GFP en este sitio de clonación. La expresión de estos genes indicadores a partir de partículas preparadas con varias combinaciones de los cartuchos de expresión de proteínas estructurales descritas en la presente memoria demuestra la utilidad y la novedad de estos cartuchos.

Los sistemas ARN auxiliares escindidos del VEE estándar, tal como se describen en la patente estadounidense No. 5.792.462, Pushko *et al.*, 1997 (Virology 239:389-401), y la publicación PCT WO 02/03917 (Olmsted, *et al.*), se describen en la presente memoria como “ARN Cap o Gp”, “ARN auxiliar de Gp de tipo salvaje”, “glicoproteína auxiliar”, “ARN auxiliar de Gp”, “GP auxiliar”, “cápside auxiliar” o “C auxiliar”. Estos ARN auxiliares se realizan a partir de ADNs plasmídicos tal como se describe en las citadas referencias, y estos ADNs plasmídicos pueden ser una fuente conveniente para obtener los fragmentos codificadores de proteínas estructurales, por ejemplo, mediante amplificación PCR. Como alternativa, estos fragmentos codificadores pueden obtenerse a partir de clones de longitud completa de VEE o de sus variantes atenuadas (véase la patente estadounidense No. 5.185.440 y la patente estadounidense 5.505.947). Estos VEE auxiliares estándares son usados en combinación con las invenciones auxiliares divulgadas en la presente memoria y/o en estudios comparativos con los nuevos sistemas, tal como se divulga en la presente memoria.

### 40 Ejemplo de referencia 3

#### *Vector ARN replicón de alfavirus reconfigurado*

La región nsP4 fue eliminada de un vector replicón que expresa GFP de VEE estándar (véase el Ejemplo 2) mediante la digestión con enzimas de restricción AvrII y ApaI, seguido del tratamiento del ADN digerido con T4 ADN polimerasa para generar extremos romos, y re-ligación del ADN para generar pGFP ΔnsP4-1. Cuando el ARN transcrito *in vitro*, a partir de ADN plasmídico de pGFP ΔnsP4-1, es electroporado en células, la GFP no es expresada. Sin embargo, la proteína GFP puede ser detectada fácilmente en células co-electroporadas con ARN de GFP ΔnsP4-1 y un ARN vector replicón no modificado. Esto demuestra que el vector pGFP ΔnsP4-1 puede ser complementado con la proteína nsP4 proporcionada *in trans* mediante otro ARN replicón. Este resultado indica que el gen nsp4 puede funcionar cuando es expresado de manera separada de las otras proteínas no estructurales.

A continuación, el gen nsP4 (incluyendo una parte de nsP3 para mantener un sitio de escisión de la proteasa nsP2) fue clonado aguas abajo de un EMCV IRES. La región nsP4 fue amplificada mediante PCR partiendo de un vector replicón de VEE estándar con cebadores nsP34-directo (ID SEC NO: 33) y nsP4-stop (ID SEC NO: 34) (véase también la Tabla 3). El fragmento del gen nsP4 amplificado fue clonado en un vector de transferencia que contenía un EMCV IRES, usando BamHI y XbaI como sitios de enzima de restricción 5' y 3'. A continuación, se usó un segundo conjunto de cebadores para amplificar la construcción EMCV-nsP4 partiendo del vector de transferencia: EMCV directo-AscI (ID SEC NO: 35) y EMCV inverso-AscI (ID SEC NO: 36), véase también la Tabla 3). El producto de la PCR de EMCV nsP4 fue digerido con enzima de restricción AscI y fue ligado en un ADN vector pGFP ΔnsP4-1 linealizado con AscI, para generar pGFP ΔnsP4-1.1. La región del gen nsP4 clonada (incluyendo una parte del nsP3 que contiene el sitio de proteasa nsP2) fue secuenciada para asegurar que no se introducían mutaciones en el gen nsP4 durante la clonación.

El ARN transcrito *in vitro* a partir de ADN de pGFP ΔnsP4-1.1 fue electroporado en células Vero, BHK, 293T y CEF, y la expresión de la proteína GFP fue detectada en todos los tipos de células.

# ES 2 330 202 T3

TABLA 3

*Cebadores PCR para el vector replicón reconfigurado*

5

10

15

20

25

30

Nombre del cebador	Secuencia 5'-3'	Región amplificada
nsP34 directo	CGGGATCCATGCGGTTTGTATGCGGGTGCATACATC (ID SEC NO: 33)	Gen nsP4 de VEE
nsP4 stop	GCTCTAGATTAGCCGTAGAGAGTTATAGGGG (ID SEC NO: 34)	Gen nsP4 de VEE
EMCV directo-Ascl	TGGCGCGCCGCTCGGAATCCCCCTCTCCC (ID SEC NO: 35)	EMCV-nsP4
EMCV inverso-Ascl	AGGCGCGCCTTCTATGTAAGCAGCTTGCC (ID SEC NO: 36)	EMCV-nsP4

Ejemplo de referencia 4

35 *Construcción de auxiliares con secuencia de reconocimiento de replicación 5' de alfavirus mínima*

A. *Construcciones para determinar la región no traducida (UTR) 5' mínima*

40 Cuando las partículas replicón de VEE (VRP) son inoculadas en cultivos frescos de células Vero, a altas multiplicidades de infección (MOI), la proteína de cápside puede ser detectada mediante un ensayo de inmunofluorescencia anti-cápside (IFA; véase la Tabla 5 más adelante). La detección de proteína de cápside en células infectadas con VRP indica que el gen de cápside está presente en la VRP. Otros autores han informado acerca de descubrimientos similares a estos (Lu y Silver, 2001, *ibid.*). Esto puede ocurrir de al menos tres maneras: 1) como resultado de un evento de recombinación entre el ARN de cápside auxiliar y un ARN replicón, 2) como resultado del co-empaquetamiento del ARN de cápside auxiliar en una partícula que contiene ARN replicón de VEE, o 3) como resultado del empaquetamiento del ARN de cápside auxiliar sólo en partículas (sin ARN replicón de VEE presente). Los VEE auxiliares descritos previamente en la técnica (Johnston *et al.*, *ibid.*, Pushko *et al.*, *ibid.*) contienen 519 nucleótidos de la región 5' del ARN de VEE. Específicamente, esta región 5' codifica una región no traducida (UTR) de 45 nt así como 474 nt del marco de lectura abierta (ORF) de nsP1. Estos ARN auxiliares fueron designados originalmente para retirar la región nucleótida de VEE para implicarla en el empaquetamiento del ARN vírico en partículas. Este diseño se basó en el trabajo realizado usando el virus Sindbis, en el que una región de nsP1, situada aproximadamente a 1.000 nt en el genoma, se creyó que codificaba la señal de empaquetamiento (Bredenbeek, PJ *et al.*, 1993 J Virol 67: 6439-6446; Lewis *et al* 1986 Cell 44:137-145; Weiss *et al.* 1989 J Virol 63:5310-8). Para optimizar adicionalmente las construcciones auxiliares, se realizaron cada vez más eliminaciones en el UTR 5' para determinar las secuencias mínimas requeridas para que los auxiliares proporcionen (i) rendimientos de VRP aceptables y (II) la frecuencia teórica mínima para el co-empaquetamiento/recombinación de genes de cápside en las preparaciones de VRP.

55 1. *Construcción de cápsides auxiliares de VEE truncadas en 5'*

60 Se construyó un plásmido cápside auxiliar que contiene la secuencia para el gen de cápside de VEE, tal como se ha descrito anteriormente. Esta construcción contiene una secuencia de 519 nucleótidos, el "UTR 5'", situado aguas arriba (es decir, 5') del codón de inicio de ATG para la secuencia codificadora de cápside, y se denomina en la presente memoria como "hcap10".

65

## ES 2 330 202 T3

### (a) Construcción basada en PCR

Se realizaron nueve eliminaciones consecutivas de aproximadamente 50 nt cada una en el UTR de 519 nt presente en la cápside auxiliar de VEE (véase el Ejemplo 2). Se realizaron las eliminaciones siguientes del extremo 3' del UTR 5':

Nombre de la construcción Hcap	nt incluidos en UTR 5'
10	1-520
1	1-484
2	1-435
3	1-397
4	1-336
5	1-294
6	1-231
7	1-185
8	1-125
9	1-46

Este conjunto inicial de construcciones de cápsides auxiliares ("Hcap") fue producido usando un método PCR que no requería de la clonación de las construcciones individuales. El procedimiento fue realizado en dos etapas separadas. Primero, se diseñaron nueve cebadores inversos (Hcap 1-9 inverso) separados ~ 50 nt, complementarios al UTR 5' hasta la posición 470 del replicón de VEE, y fueron modificados para contener un sitio de restricción ApaI:

Nombre del cebador	ID SEC NO:
48-132-pr2	39
48-132-pr4	40
48-132-pr6	41
48-132-pr8	42
48-132-pr10	43
48-132-pr12	44
48-132-pr14	45
48-132-pr16	46
48-132-pr18	47

Las secuencias de cada uno de estos cebadores se presentan en la Tabla 4. Un cebador Hcap directo, 13-101.pr1 (ID SEC NO: 37) (véase también la Tabla 4) fue diseñado de manera que cuando el mismo fuera usado en combinación con cualquiera de los cebadores inversos, amplificaría un fragmento que contiene el promotor T7 y la eliminación en UTR 5' respectiva. Segundo, los cebadores fueron diseñados para amplificar el gen de cápside partiendo del plásmido cápside auxiliar existente de manera que el fragmento tendría la composición siguiente: sitio de restricción ApaI 5', promotor 26S, gen de cápside, 3' UTR-3'. Estos cebadores son 48-132.pr1 (ID SEC NO: 48) y 3-8pr4 (ID SEC NO: 49) (véase también la Tabla 4). Los productos de PCR amplificados fueron digeridos con enzima ApaI y fueron ligados entre sí en el sitio ApaI común. Estos ADNs ligados fueron usados como plantilla para amplificar mediante PCR cada una de las construcciones Hcap usando los cebadores 13-101.pr1 (ID SEC NO: 37) y 13-101.pr4 (ID SEC NO: 38), que flanquean las regiones 5' y 3' de cada auxiliar, respectivamente. Los ADNs auxiliares de Hcap amplificados fueron usados para transcribir ARN *in vitro* para el uso en experimentos de empaquetamiento de VRP.



## ES 2 330 202 T3

cápside auxiliar estándar con cebadores 48-132.pr1 y 3-8pr4, tal como se ha descrito anteriormente, fue digerido con enzimas de restricción ApaI y NotI y fue ligado en cada uno de los auxiliares-Δ linealizados también con enzimas de restricción ApaI y NotI.

### 5 B. *Análisis de construcciones auxiliares truncadas*

Cada una de las construcciones auxiliares truncadas fue ensayada separadamente para su capacidad para empaquetar ARN replicón que expresa un inmunógeno (por ejemplo, la proteína Gag del VIH) en VRPs. 30 μg de cada uno de los 3 ARNs (es decir, la cápside auxiliar truncada, Gp auxiliar de VEE estándar, y un ARN replicón que expresa Gag del VIH) fueron electroporados en células CHO o VERO.

#### 1. *Análisis IFA de células CHO electroporadas*

15

TABLA 5

*Análisis de células CHO electroporadas*

20

25

30

35

40

Muestra	GAG	Cápside	Gp
Hcap1	>90%	20%	>90%
Hcap2	>90%	15%	>90%
Hcap3	>90%	15%	>90%
Hcap4	>90%	10%	>90%
Hcap5	>90%	5%	>90%
Hcap6	>90%	5%	>90%
Hcap7	>90%	5%	>90%
Hcap8	>90%	<1%	>90%
Hcap9	>90%	<1%	>90%
Hcap10	>90%	>90%	>90%

#### 2. *Análisis de empaquetamiento/recombinación en células CHO*

Los estudios de empaquetamiento/recombinación fueron realizados en VRP generada en células CHO (Tabla 6). La titulación de las partículas que expresan la cápside y VRP GAG resultantes fueron determinadas mediante infección de células frescas y realizando un IFA para proteína de cápside o GAG.

Se generaron VRP de alta titulación ( $> 1 \times 10^8$ /ml) en células CHO usando Hcap-1 a Hcap-6. La mayoría de las preparaciones de VRP de células CHO generadas con estos ARN de Hcap tenían un factor de reducción de 20 a  $>100$  en la titulación de coempaquetamiento/recombinación de cápside, en comparación con Hcap 10 (la cápside auxiliar "UTR 5'" de longitud completa estándar).

55

60

65

ES 2 330 202 T3

TABLA 6

Muestra	VRP GAG titulación/ml	Cápside titulación/ml	Factor de reducción de titulación cápside vs hcap10
Hcap1	$2,5 \times 10^8$	$1,4 \times 10^3$	23,6
Hcap2	$1,0 \times 10^8$	$1,4 \times 10^3$	23,6
Hcap3	$1,8 \times 10^8$	$7,1 \times 10^2$	46,5
Hcap4	$1,4 \times 10^8$	$2,6 \times 10^2$	126,9
Hcap5	$1,1 \times 10^8$	$1,4 \times 10^3$	23,6
Hcap6	$1,7 \times 10^8$	$6,7 \times 10^3$	4,9
Hcap7	$8,8 \times 10^7$	$1,4 \times 10^3$	23,6
Hcap8	$2,8 \times 10^6$	nd	nd
Hcap9	$7,4 \times 10^6$	$3,5 \times 10^2$	94,3
Hcap10	$3,4 \times 10^8$	$3,3 \times 10^4$	0,0
nd: no determinado			

3. Análisis de empaquetamiento/recombinación en células Vero usando auxiliares seleccionados

Los clones plásmidos fueron preparados para los UTRs 5' truncados de Hcap 1 a Hcap4, y los clones fueron secuenciados para confirmar su identidad. Usando el auxiliar truncado Hcap4 para proporcionar la proteína de cápside, se produjeron VRPs después de la co-electroporación en células Vero con una Gag del VIH, un ARN replicón de VEE y un ARN auxiliar de Gp estándar (véase el Ejemplo 2).

Se realizó un análisis IFA de las células Vero infectadas con estos VRPs a un MOI de ~ 50-100 (para garantizar el 100% de infección de las células) 16 h después de la infección usando un anticuerpo anticápside. El número de células IFA positivas para cápside fue determinado por cada campo a una amplificación de 10X, y este número se usó para calcular una titulación de coempaquetamiento/recombinación para cápside por cada milímetro. La Tabla 7 proporciona los resultados usando este auxiliar truncado, en comparación con la cápside auxiliar estándar ("Heap 10").

TABLA 7

*Titulaciones VRP y cápside en células Vero usando auxiliar Hcap4*

Muestra	VRP GAG titulación/ml	Cápside titulación/ml	Veces de reducción titulación cápside vs heap 10
Hcap4	$9,6 \times 10^8$	$1,3 \times 10^4$	36,2
Hcap10	$1,2 \times 10^9$	$4,7 \times 10^5$	0,0

## ES 2 330 202 T3

Ejemplo de referencia 4

*Auxiliares impulsados por T7 polimerasa*

5 **A. Glicoproteína auxiliar de VEE impulsada por T7 polimerasa**

Los genes de glicoproteína (Gp) de la Gp auxiliar son amplificados mediante PCR y son clonados aguas abajo de un EMC IRES. A continuación, el fragmento EMC/Gp es clonado en pCRBlunt (Invitrogen, Carlsbad, CA) bajo el control de un promotor de la T7 ARN polimerasa. La transfección de este ADN pCRBlunt-EMC/Gp (Fugene 6, 10 Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) en células BHK-21 que expresan la proteína de la T7 ARN polimerasa resultó en la expresión de la proteína Gp de VEE en las células transfectadas con el ADN, tal como se determina mediante IFA.

15 **B. Resolver el ADN auxiliar de VEE impulsado por la T7 polimerasa**

*Construcción del auxiliar para la resolución de ADN de VEE*

La proteína de cápside de VEE es amplificada a partir de un plásmido C auxiliar estándar (véase el Ejemplo 2) usando el cebador VEECapF/XbaI (ID SEC NO: 23) y el cebador VEECapR/BamHI (ID SEC NO: 24) (véase también 20 la Tabla 8). El producto resultante de la PCR es clonado en pCR4-TOPO (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), resultando en pC4-Vcápside, y la orientación es verificada mediante un análisis de enzima de restricción con SpeI. Los genes de la glicoproteína de VEE son amplificados mediante PCR a partir del plásmido Gp auxiliar estándar usando el cebador VEEGpTEP/BamHI (que contiene la secuencia de 21 nt que codifica la secuencia de reconocimiento de la proteasa del virus “etch” del tabaco (TEP); ID SEC NO: 25) y el cebador VEEGpR/EcoRV (ID SEC NO: 26) (véase también 25 la Tabla 8) seguido de una digestión con enzima de restricción con BamHI. El clon pCR4-Vcápside es digerido con BamHI y PmeI y es ligado con el producto de PCR VEEGp digerido con BamHI para generar un cartucho codificador de proteína estructural con la secuencia de reconocimiento de proteasa entre las secuencias de cápside y Gp. El EMCV IRES es amplificado mediante PCR a partir de pIRES usando los cebadores EMCV-2 directo (ID SEC NO: 17) e inverso (ID SEC NO: 18), es digerido con NheI y es clonado en un sitio de enzima de restricción XbaI del pCR4-VSp, 30 y la orientación es verificada mediante análisis PCR con EMCV-2 directo y VEECapR/BamHI.

TABLA 8

*Cebadores para auxiliar de resolución de ADN impulsado por promotor de T7*

35

Cebador	Secuencia de cebador
VEECapF/XbaI	5'-GTCTAGAATGTTCCCGTTCACCAATG-3' (ID SEC NO: 23)
VEECapR/BamHI	5'-CGGGATCCCCATTGCTCGCAGTTCTCCGG-3' (ID SEC NO: 24)
VEEGpTEP/BamHI	5'CGGGATCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCATGTC ACTAGTGACCACCATGTGTCTGCTCGCC-3' (ID SEC NO: 25)
VEEGpR/EcoR V	5'-CGATATCTCAATTATGTTTCTGGTTG-3' (ID SEC NO: 26)

55

Ejemplo 5

*Auxiliares no replicantes impulsados por promotor de la Pol II*

60

**A. Construcción de auxiliares**

Los genes de la proteína estructural de alfavirus son amplificados mediante PCR usando cebadores específicos de genes que poseen sitios de enzima de restricción únicos y son clonados aguas abajo de un promotor de la ADN polimerasa II para expresión génica en las células transfectadas. En el caso de las construcciones VEE, los genes de Gp y/o la cápside fueron amplificados mediante PCR a partir del C auxiliar o de la Gp auxiliar y fueron clonados en pCDNA-3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) bajo el control de un promotor de CMV. Ninguno de los promotores retuvo ninguna secuencia de ARN 26S, UTR 3' o UTR 5' de VEE. Se generaron las siguientes construcciones:

65

## ES 2 330 202 T3

Nombre:	Producto de expresión:
pCDNA-VCap	Proteína de cápside de VEE
pCDNA-VcapCleave	Proteína de cápside de VEE y 8 aminoácidos de la proteína E3
pCDNA-VGp(X/X/N)	Gps de VEE
pCDNA-VSp	Proteína de cápside de VEE y Gps (todas proteínas estructurales de VEE)

Para construir pCDNA-VSp, el gen de la glicoproteína de VEE fue amplificado mediante PCR a partir del plásmido Gp auxiliar estándar (véase el Ejemplo 2) usando el cebador VEEGpF/XbaI (ID SEC NO: 27) y el cebador VEEGpR/NheI (ID SEC NO: 28) (véase también la Tabla 9). El producto de la PCR resultante fue digerido con enzimas de restricción XbaI y NheI y fue clonado en el sitio XbaI de pCDBA3.1(-) para generar pCDNa-VGp(X/N). La orientación con respecto al promotor inmediato temprano del CMV fue verificada mediante un análisis de enzima de restricción con XbaI y SpeI. El gen de cápside de VEE de longitud completa fue amplificado mediante PCR a partir del plásmido C auxiliar estándar (véase el Ejemplo 2) usando el cebador VEECapF/XbaI (ID SEC NO: 29) y los cebadores 3-42pr4 (ID SEC NO: 30) (véase también la Tabla 9). Este producto de PCR fue digerido con XbaI y fue ligado en pCDNA-VGp(X/N) en el sitio de enzima de restricción XbaI para generar pCDNA-VSp. La orientación fue verificada mediante análisis de enzima de restricción con SpeI.

TABLA 9

*Cebadores para construir pCDNa-VSp*

Cebador	Secuencia
VEEGpF/XbaI	5'-GTCTAGAATGTCCCTAGTGACCACCATG-3' (ID SEC NO: 27)
VEEGpR/NheI	5'-GCGCTAGCGTCAATTATGTTTCTGGTTG-3' (ID SEC NO: 28)
VEECapF/XbaI	5'-GTCTAGAATGTTCCCGTTCCAACCAATG-3' (ID SEC NO: 29)
3.42pr4	5'-CAATCGCCGCGAGTTCTATG-3' (ID SEC NO: 30)

### B. Transfección con pCDNA-VSp

Células 293T en matraces T-175 fueron transfectadas con 20 µg de ADN de pCDNA-VSp usando Fugene® (Roche, Indianápolis, IN) o Lipofectamina® 2000 (LF2K; Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) y las células fueron incubadas durante 6 h a 24 h a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%. Las células fueron tripsinizadas, lavadas dos veces en PBS y resuspendidas a 1,2x10<sup>7</sup> células/ml en 800 µl de PBS. A continuación, las células fueron mezcladas con 30 µg de un ARN replicón de alfavirus que codifica GFP y fueron trasferidas a una cubeta de electroporación con un hueco de 0,4 cm. Las células y el ARN fueron pulsados tres veces a 450 V y 25 µF. Después de 10 minutos a temperatura ambiente, las células fueron sembradas en matraces T75 con 25 mls DMEM + FBS al 10%. Alícuotas de las muestras de cada electroporación fueron introducidas en placas de 96 pocillos para un análisis de inmunofluorescencia y todas las células fueron incubadas a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%.

Aproximadamente a las 16 h después de la electroporación, las células en las placas de 96 pocillos fueron fijadas con formaldehído al 2%; glutaraldehído al 0,2% y fueron analizadas para la expresión de proteína GFP. Las muestras fueron fijadas de manera alternada con MeOH y fueron analizadas mediante IFA para la expresión de proteína Gp y cápside de VEE. Los resultados se exponen en la Tabla 10, como un porcentaje de las células electroporadas que expresan proteína.

## ES 2 330 202 T3

TABLA 10

*Porcentaje de células que expresan proteína 16 h después de la electroporación*

Auxiliar	Tiempo*	GFP	Cápside de VEE	Gp de VEE
ARN de Cap/Gp	6 h	50%	50%	50%
ARN de Cap/Gp	24 h	80%	>50%	>50%
VSp (Fugene)	6 h	80%	<1%	1%
VSp (Fugene)	24 h	>80%	<1%	30%
VSp	6 h	80%	10%	50%
(LF2K)				
VSp (LF2K)	24 h	>80%	1%	80%
* Tiempo transcurrido desde la formación con auxiliares hasta que la células fueron recolectadas para la electroporación con ARN replicón de GFP				

Un análisis Western demuestra la presencia y el procesamiento apropiado de la proteína de cápside en las células transformadas con pCDN-FSp.

### C. Producción de VRP que expresa GFP usando ADNs auxiliares

Cada una de las construcciones descritas en (A.) fueron ensayadas separadamente o en combinación para su capacidad para empaquetar partículas replicón que expresan un indicador (por ejemplo, proteína GFP).

#### 1. Células 293T

Las células 293T transformadas con construcciones de ADN fueron electroporadas con 30  $\mu$ g de ARN que expresa GFP. 30  $\mu$ g de ARNs de cápside o Gp auxiliar fueron incluidos en la electroporación de células que recibieron sólo ADNs de Gp o cápside, respectivamente. Aproximadamente 24 h después de la electroporación del ARN replicón, tal como se describe en (B.), el medio de cultivo fue recolectado y los desechos celulares fueron retirados mediante centrifugación en un rotor de cubeta oscilante durante 5 minutos a 2.000 rpm. El sobrenadante fue transferido a nuevos pocillos cónicos de 50 ml y fue almacenado a 4°C. Se prepararon diluciones seriadas con factor 10 (1:10) del medio de cultivo clarificado, que contenía GFP-VRPs de alfavirus, y se inocularon 30  $\mu$ l de cada dilución en células Vero en placas de 96 pocillos. Las células fueron incubadas durante la noche a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% seguido por fijación en formaldehído al 2% / glutaraldehído al 0,2%. Las titulaciones fueron determinadas contando el número de células GFP positivas en 5 campos en la dilución más baja posible. Los resultados se exponen en la Tabla 11, a continuación:

(Tabla pasa a página siguiente)

## ES 2 330 202 T3

TABLA 11

*Producción de GFP VRP usando ADN auxiliares*

Muestra	Titulación/ml de VRP	IFA para GFP*	IFA para cápside*	IFA para Gp*
Control **	$1,5 \times 10^6$	>80%	20%	20%
VCap	$6,4 \times 10^4$	50%	20%	10%
CapCleave	$1,0 \times 10^5$	50%	20%	10%
VGp(X/X/N)	$4,3 \times 10^4$	50%	20%	20%
VSp	$1,9 \times 10^5$	50%	1%	30%
CapCleave + VGp(X/X/N)	$4,3 \times 10^4$	50%	20%	20%
* Porcentaje de células electroporadas positivas para expresión de GFP, cápside o proteína GP				
** (controles = partículas replicón GFP generadas usando ARN auxiliares de Gp y cápside de VEE)				

### 2. Optimización de transfección de ADN en células 293T seguido por electroporación usando pCDNA-VSp

Aproximadamente 24 h después de la electroporación del ARN replicón, tal como se describe en (B.), el medio de cultivo fue recolectado y los desechos celulares fueron retirados mediante centrifugación en un rotor de cubeta oscilante durante 5 minutos a 2.000 rpm. El sobrenadante fue transferido a nuevos pocillos cónicos de 50 ml y fue almacenado a 4°C. Se prepararon diluciones seriadas con factor 10 (1:10) del medio de cultivo clarificado, que contenían GFP-VRPs de alfavirus, y se inocularon 30  $\mu$ l de cada dilución en células Vero en placas de 96 pocillos. Las células fueron incubadas durante la noche a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% seguido por fijación en formaldehído al 2%/glutaraldehído al 0,2%. Las titulaciones fueron determinadas contando el número de células GFP positivas en 5 campos en la dilución más baja posible. Los resultados se exponen en la Tabla 12.

TABLA 12

*Titulaciones de VRP generado usando pCDNA-VSp auxiliar*

Auxiliar	Tiempo *	Titulación (VRP/ml)
ARN de Cap/Gp	6h	$1,49 \times 10^7$
ARN de Cap/Gp	24h	$5,69 \times 10^7$
VSp (Fugene)	6h	$2,13 \times 10^5$
VSp (Fugene)	24h	$2,13 \times 10^6$
VSp (LF2K)	6h	$9,26 \times 10^5$
VSp (LF2K)	24h	$2,85 \times 10^6$
* Tiempo desde de la formación con auxiliares hasta que las células fueron recolectadas para la electroporación subsiguiente con ARN replicón de GFP		

## ES 2 330 202 T3

### D. Producción de VRP que expresa Gag del VIH usando pCDNA-VSp auxiliar

Células 293T en matraces T175 fueron transfectadas con ADN de pCDNA-VSp, tal como se ha indicado anteriormente, fueron recolectadas 6 h más tarde, y a continuación fueron electroporadas con 30  $\mu\text{g}$  de ARN replicón Gag del VIH (véase Olmsted, *et al.*, WO 02/03917). Las células electroporadas fueron sembradas en matraces T75 y alícuotas de las muestras fueron introducidas en placas de 96 pocillos. A las 16 h después de la electroporación, las muestras de las células auxiliares en las placas de 96 pocillos fueron fijadas en metanol y fueron analizadas mediante IFA para expresión de proteína Gp de VEE, cápside de VEE o Gag del VIH.

El medio de cultivo que contenía las VRPs liberadas de las células electroporadas fue recolectado, y se midieron titulaciones para determinar la producción de partículas alfavirus recombinantes. Las titulaciones para VRP que expresa Gag del VIH, así como el coempaquetamiento de cápside y Gp/recombinantes individuales, fueron determinados mediante IFA (Tabla 13).

TABLA 13

*Titulaciones GAG VRP y coempaquetado con ADNs auxiliares de VSp*

Auxiliar	HIV-Gag VRP/ml	Cápside (FFU/ml)	Gp (FFU/ml)
ARN de Cap/Gp	$7,75 \times 10^6$	$1,03 \times 10^3$	$1,42 \times 10^3$
pCDNA-VSp	$1,64 \times 10^6$	no detectado	no detectado

Los resultados en la Tabla 13 demuestran que las titulaciones HIV-Gag VRP del pCDNA-Vsp auxiliar fueron menos de diez veces inferiores que las titulaciones obtenidas con el sistema ARN auxiliar bipartito ("ARN de Gap/Gp") mientras que las frecuencias de empaquetamiento/recombinación se redujeron en al menos tres órdenes de magnitud.

Ejemplo de referencia 6

### *Construcción de ADNs auxiliares de resolución*

#### *A. ADN auxiliar A de resolución*

Los genes de la proteína estructural de la glicoproteína y de la cápside de alfavirus son clonados en dos posiciones separadas en la molécula de ADN auxiliar individual. Al menos un gen estructural, situado en la primera posición, es clonado directamente aguas abajo de un promotor de la ARN polimerasa II (pol II) dependiente de ADN. Uno o más genes estructurales, no codificados en la primera posición, están situados en la segunda posición, estando posicionados aguas abajo de la primera posición, de manera que la transcripción resultante de la expresión dirigida por el promotor de la pol II contiene un elemento IRES directamente 5' al gen o los genes de proteína estructural en la posición aguas abajo.

Un método de construcción emplea primero una amplificación mediante PCR de las proteínas estructurales de la glicoproteína o la cápside de alfavirus usando cebadores específicos del gen estructural que codifican también para sitios de enzima de restricción únicos. La secuencia que codifica el gen o los genes de la proteína estructural situados en la primera posición es clonada directamente en el vector de expresión basado en el promotor de la ARN polimerasa II (pol II) dependiente de ADN elegido. La secuencia que codifica el gen o los genes de la proteína estructural en la segunda posición es clonada inicialmente en un vector de transferencia que contiene una secuencia IRES de manera que la transcripción eventualmente resultante de la expresión dirigida por el promotor contendrá un elemento IRES directamente 5' a la secuencia codificadora del gen o los genes de la proteína estructural en la segunda posición.

Para insertar la secuencia de ribozima, los cebadores complementarios superpuestos que codifican una ribozima se aparean para producir una secuencia de unión a ribozima con sitios de restricción 5' y 3' únicos en cada extremo. A continuación, el fragmento del gen de proteína estructural de IRES es digerido fuera del vector de transferencia, y el vector de expresión de la pol II es digerido en el sitio de restricción 3' único de la secuencia codificadora del gen o los genes en la primera posición y en otro sitio de restricción único, situado más aguas abajo, que es compatible con el sitio 3' del fragmento de ADN del gen de la proteína estructural de IRES. La construcción es completada ligando el fragmento del gen de la proteína estructural de IRES y el vector de expresión de la pol II juntos en los sitios 5' y 3' compatibles en los extremos de la secuencia del enlace de unión de la ribozima.

#### *Construcción de un VEE auxiliar A*

El gen de la glicoproteína (GP) del VEE es amplificado con los cebadores GP directo (ID SEC NO: 1) y GP inverso (ID SEC NO: 2) (véase también la Tabla 1) y el gen de la cápside (C) del VEE es amplificado con los

## ES 2 330 202 T3

cebadores C directo (ID SEC NO: 5) y C inverso (ID SEC NO: 6) (véase también la Tabla 1) usando plásmidos GP-auxiliar y C-auxiliar como plantillas para la PCR, respectivamente (por ejemplo, Pushko *et al*, 1997). El producto de PCR de la GP de VEE es digerido con enzimas de restricción NheI y ApaI y es ligado en un vector adecuado linealizado con las mismas enzimas de restricción y que contiene un promotor de la pol II, tal como pCDNA3.1 disponible comercialmente (Invitrogen, Carlsbad, CA; nótese que este vector, así como otros vectores disponibles comercialmente, está modificado con un marcador seleccionable para el uso del plásmido comprado en un cultivo de células de mamífero, pero debido a que las invenciones reivindicadas no requieren de dicho marcador, este es retirado previamente a la inserción de la secuencia o secuencias codificadoras de la proteína estructural del VEE). Al emplear pCDNA3.1, el gen de la GP del VEE está situado entonces aguas abajo del promotor inmediato temprano (IE) del CMV, generando pCDNA3.1/sp1.

El fragmento de PCR de la cápside del VEE es digerido con enzimas de restricción XbaI y SalI y es ligado en un vector adecuado linealizado con las mismas enzimas de restricción y que contiene IRES, tal como el ADN pIRES linealizado con XbaII/SalI disponible comercialmente (Clontech, Palo alto, CA). Esta manipulación genera pIRES/sp2. Los cebadores complementarios superpuestos hδR-directo (ID SEC NO: 7) y hδR-inverso (ID SEC NO: 8) (véase también la Tabla 1), que codifican la ribozima de la hepatitis delta (hδR), se aparean entre sí para generar una secuencia de unión de hδR con los sitios de restricción ApaI y XhoI en los extremos 5' y 3', respectivamente. La parte vector de la construcción es producida mediante la digestión de pCDNA3.1/sp1 con enzimas de restricción ApaI y NotI. Un fragmento de IRES/sp2 XhoI/NotI de 1502 pares de bases digerido del ADN de pIRES/sp2 y el fragmento de unión de hδR ApaI/XhoI son ligados a continuación con pCDNA3.1/ps1 linealizado con ApaI/NotI para generar el VEE auxiliar A.

### B. Resolución de los ADNs auxiliares B y C

Para construir otras realizaciones de la invención, un vector auxiliar de la proteína estructural del alfavirus (por ejemplo, que comprende una secuencia de reconocimiento de replicación 5' alfaviral, bien un promotor transcripcional de alfavirus (en la presente memoria, Auxiliar B, por ejemplo, un promotor subgenómico de alfavirus 26S) o bien un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) (en la presente memoria Auxiliar C, por ejemplo, el EMCV IRES), una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el gen o los genes de la proteína estructural del alfavirus aguas arriba y una secuencia de reconocimiento de replicación 3' de alfavirus) es clonado directamente en un vector de expresión basado en el promotor de la pol II elegido (véase el Ejemplo 5). De manera concomitante, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el gen o los genes de la proteína estructural del alfavirus en el fragmento aguas abajo es clonada en un vector de transferencia que contiene una secuencia IRES, tal como se describe en la presente memoria. Para conformar el Auxiliar B, el fragmento de la secuencia que codifica la proteína estructural de IRES es a continuación digerido del vector de transferencia y el fragmento liberado es ligado en el vector de expresión del promotor, de manera que el promotor de la pol II dirige la expresión de las proteínas estructurales en ambas posiciones aguas arriba y aguas abajo.

El Auxiliar C es preparado en dos etapas a partir del Auxiliar B. La primera etapa es retirar el promotor 26S del Auxiliar B, mientras se introduce un sitio de restricción único en su sitio. La segunda etapa es clonar una secuencia IRES en el sitio de restricción único modificado.

### Construcción de un VEE auxiliar B

El promotor de CMV IE es amplificado mediante PCR a partir de pIRES2-DsRed2 (Clontech) usando el cebador CMV directo (ID SEC NO: 9) y el cebador CMV inverso (ID SEC NO: 10) (véase también la Tabla 1). La región que no codifica el 5' de VEE, el promotor 26S, el gen de GP y la región que no codifica el 3' de VEE es amplificada a partir de un plásmido GP auxiliar (véase el Ejemplo 4A) usando el cebador directo GP-2 (ID SEC NO: 3) y el cebador inverso GP-2 (ID SEC NO: 4) (véase también la Tabla 1). El producto de PCR CMV IE y el producto de PCR GP-auxiliar tienen una región de 53 nt de homología en sus extremos 3' y 5', respectivamente. Esta región de homología permite una reacción PCR de solapamiento para producir una construcción génica que contiene el promotor CMV IE que inicia la transcripción en el extremo 5' de VEE de la secuencia GP-auxiliar. A continuación, el fragmento CMV IE/GP-auxiliar es digerido con enzima de restricción NheI. El vector pCDNA3.1 basado en el promotor de la pol II es linealizado con enzima de restricción BglII y a continuación es tratado con T4 ADN polimerasa para producir un extremo romo. El vector es digerido adicionalmente con NheI para liberar los promotores de CMV IE y de la T7 ARN polimerasa existentes del vector. A continuación, el producto de PCR CMV IE/GP-auxiliar digerido con NheI es ligado en el vector pCDNA3.1 digerido con BglII (tratado con T4)/NheI generando pCDNA3.1/sp 1.2. El fragmento XhoI/NotI IRES/sp2 de 1502 pares de bases digerido del ADN pRES/sp2 y el fragmento de enlace ApaI/XhoI hδR son ligados con pCDNA3.a/sp1.2 linealizado con ApaI/NotI para generar el VEE auxiliar B.

### Construcción del auxiliar C de VEE

La eliminación del promotor 26S en el auxiliar B se consigue mediante PCR, usando dos conjuntos de cebadores. El primer conjunto de cebadores (directo d26S (ID SEC NO: 11) e inverso d26S (ID SEC NO: 12); véase también la Tabla 1) amplifican un fragmento que contiene la región que no codifica (NCR) el 5' del VEE y el CMV IE. El cebador inverso d26S se aparea aguas arriba del promotor 26S de manera que no está incluido en el producto de PCR. El producto de PCR CMV IE/VEE 5' NCR codifica un sitio 5' PvuI, que se encuentra en el esqueleto del ADN del auxiliar B, y un sitio de restricción AscI único modificado en el extremo 3' del VEE 5' NCR. El segundo conjunto de cebadores (directo E3 (ID SEC NO: 13) e inverso 6K (ID SEC NO: 14), véase también la Tabla 1) amplifica un

## ES 2 330 202 T3

producto que contiene la región VEE E3-6K de la GP-auxiliar que tampoco contiene el promotor 26S. El producto E3-6K contiene un sitio 5' AscI modificado y un sitio de restricción 3' SgrAI único que se encuentra en el gen 6K. Después de la amplificación mediante PCR, el producto CMV IE/VEE 5' NCR es digerido con enzimas de restricción PvuI y AscI, y el producto E3-6K es digerido con enzimas de restricción AscI y SgrAI. El ADN del auxiliar B (véase la descripción anterior) es digerido con enzimas de restricción PvuI y SgrAI para liberar la región CMV IE-VEE 5' NCR-26S-E3-6K. A continuación, un nuevo auxiliar es reconstituido ligando el fragmento CMV IE/VEE 5' NCR digerido con PvuI/AscI y el fragmento E3-6K digerido con AscI/SgrAI con el vector auxiliar B digerido con PvuI/SgrAI, generando el auxiliar B.2. El auxiliar B.2 es idéntico al auxiliar B exceptuando que el promotor 26S ha sido eliminado y ha sido remplazado por un sitio de restricción AscI único.

El EMCV IRES es amplificado partiendo del vector pIRES usando el cebador directo EMCV (ID SEC NO: 15) y el cebador inverso EMCV (ID SEC NO: 16), los cuales contienen sitios de restricción 5' AscI modificados (véase también la Tabla 1). Después de la amplificación, el producto de PCR EMCV IRES es digerido con enzima de restricción AscI y es ligado en ADN del auxiliar B.2 linealizado con AscI, generando el auxiliar C.

### C. Resolución del auxiliar D de ADN

Otra realización de la presente invención puede ser construida modificando el auxiliar A para que contenga un elemento IRES que dirige la traducción independiente de cap de las proteínas estructurales del alfavirus en la posición aguas arriba así como en la posición aguas abajo, una construcción denominada en la presente memoria como auxiliar D.

#### Construcción de auxiliar D de VEE

El EMCV IRES es amplificado a partir del vector pIRES usando el cebador directo EMCV-2 (ID SEC NO: 17) y el cebador inverso EMCV-2 (ID SEC NO: 18), conteniendo cada uno sitios de restricción 5' NheI modificados (véase también la Tabla 1). Después de la amplificación, el producto de PCR EMCV IRES es digerido con enzima de restricción NheI y es ligado en un VEE auxiliar A linealizado con NheI, generando el VEE auxiliar D de VEE.

Ejemplo de referencia 7

#### ARN auxiliares de alfavirus quiméricos

##### A. Construcción de VEE-SIN auxiliar

El gen de la cápside del VEE fue clonado en el sitio de restricción XbaI del vector replicón pSINrep5 (InVitrogen, Carlsbad, CA). Se construyeron auxiliares basados en Sindbis, que contienen el gen de la cápside del VEE, eliminando partes de la región Sindbis nsP de la construcción pSINrep5/VEEcápside. El ADN de pΔSIN/VEEcápside fue preparado digiriendo el ADN de pSINrepS/VEEcápside con enzimas de restricción SmaI y BamHI, eliminando 6.567 pares de bases (pb) de los genes nsP. Una segunda construcción auxiliar (pΔSIN/VEEcap-2), que carece de 667 pares de bases adicionales de la región nsP, fue preparada mediante la amplificación mediante PCR de una región de pΔSIN/VEEcápside, usando el cebador directo ΔSIN26S/RsrII (ID SEC NO: 31) y el cebador inverso ΔSIN-ApaI (ID SEC NO: 32) (véase también la Tabla 14) y ligándola en el ADN de pΔSIN/VEEcápside linealizado con RsrII y ApaI.

TABLA 14

*Cebadores PCR usados para generar ΔSIN/VEEcap-2*

Cebador	Secuencia 5'-3'	Región amplificada
Directo ΔSIN26S/RsrII	TTTCGGACCGTCTCTACGGTGGTCCTAAATAGTC (ID SEC NO: 31)	nsP y cápside de VEE
Inverso ΔSIN-ApaI	CTGGTCGGATCATTGGGCC (ID SEC NO: 32)	nsP y cápside de VEE

## ES 2 330 202 T3

### B. Producción de VRP que expresa Gag del VIH usando un alfavirus quimérico auxiliar

Los auxiliares  $\Delta$ SIN/VEEcápside o  $\Delta$ SIN/VEEcap-2 fueron usados para generar VRP en células Vero con un ARN de Gp de VEE auxiliar (tal como se ha descrito en la presente memoria) y un ARN replicón de VEE que expresa el gen de la Gag del VIH. El medio de cultivo que contiene el VRP de la Gag del VIH, generado usando el  $\Delta$ SIN/VEEcápside auxiliar o el  $\Delta$ SIN/VEEcap-2 auxiliar, fue recolectado, y la producción de VRPs se determinó usando un IFA para la Gag del VIH. Usando el  $\Delta$ SIN/VEEcápside auxiliar se obtuvo una titulación de VRP de  $2,6 \times 10^6$ /ml; usando el  $\Delta$ SIN/VEEcap-2 auxiliar se obtuvo una titulación de  $1,9 \times 10^6$ /ml.

10 Ejemplo de referencia 8

#### Construcción de ARN auxiliares basados en Nodavirus

15 Generalmente, las construcciones se producen como se indica a continuación. El gen de la cápside de alfavirus es amplificado mediante PCR con cebadores específicos de gen que introducen sitios de enzima de restricción. El producto amplificado mediante PCR es clonado directamente en un ARN2 de Nodavirus (generado a partir de virus flock house (FHV) o nodamura (NoV)), el cual es digerido con enzimas de restricción compatibles.

20 *Construcción de cápside de VEE Nodavirus auxiliares*

El gen de la cápside de VEE es amplificado mediante PCR con el cebador cápside F (MluI) (ID SEC NO: 19) y el cebador cápside R (MluI) (ID SEC NO: 20) que introduce un sitio MluI (véase también la Tabla 1), usando pCDNA VSp (véase el Ejemplo 5) como plantilla. El producto de PCR cápside de VEE es digerido con MluI y es ligado en el vector FHV RNA2 digerido con MluI y el NoV RNA2 digerido con BssHIII. La digestión con BssHIII produce extremos cohesivos compatibles con MluI. Los clones resultantes son secuenciados para determinar la orientación y para verificar la exactitud de la secuencia.

30 Como alternativa, el gen de la cápside de VEE puede ser clonado direccionalmente en los sitios NcoI y MluI de FHV RNA2 y los sitios NcoI y BssHIII de NoV RNA2. Este sitio NcoI es 5' a los sitios MluI o BssHIII en el FHV y NoV RNA2, respectivamente, separados por un nucleótido. El gen de la cápside de VEE es amplificado mediante PCR con uno dos de entre dos cebadores directos que contienen un sitio NcoI, cápside F1 (NcoI) (ID SEC NO: 21) y cápside F2 (NcoI) (ID SEC NO: 22), y un cebador inverso que contiene un sitio MluI, cápside R (MluI) (ID SEC NO: 20), usando pCDNA VSp (véase el Ejemplo 5) como plantilla. Los productos resultantes de la PCR, cápside 1 de VEE y cápside 2 de VEE, son digeridos con NcoI y MluI y son ligados en el vector FHV RNA2 digerido con NcoI/MluI y el vector NoV RNA2 digerido con NcoI/BssHIII.

Además, el gen de la glicoproteína de VEE y la totalidad del cartucho génico de la proteína estructural de VEE pueden ser clonados en los vectores de expresión FHV RNA2 y NoV RNA2, tal como se ha descrito anteriormente, usando cebadores apropiados.

45 La cápside de nodavirus auxiliar descrita en la presente memoria es co-electroporada en células VERO a 28°C con RNA1 de nodavirus, una GP de VEE auxiliar (por ejemplo, véase Pushko *et al.* 1997, *ibid.*) y un ARN replicón de VEE que expresa la proteína Gag del VIH (véase Olmsted *et al.*, WO 02/03917). Cuando se usan los FHV RNA 1 y 2, la producción de partículas de alfavirus recombinantes es de  $4,3 \times 10^6$  por ml. Cuando se usan NoV RNA 1 y 2, la producción de partículas es de aproximadamente  $2 \times 10^5$  por ml.

50 Ejemplo 9

*Producción de partículas replicón usando ADN o ARN auxiliares*

El ARN replicón y los ácidos nucleicos auxiliares pueden ser introducidos en la célula auxiliar mediante una o más de entre las diferentes técnicas conocidas generalmente en la técnica, por ejemplo, electroporación, transfección (por ejemplo, usando precipitación de fosfato de calcio o ácidos nucleicos depositados en microgotas o nanopartículas), captación de ADN mediada por lípidos, micro-proyectiles o nano-proyectiles, transformación estable, mediante incorporación en un vector viral, tal como adenovirus, SV40, poxvirus (por ejemplo, vaccinia Ankara modificado), nodavirus o virus adenoasociados, o mediante recubrimiento en un vector vírico, tal como adenovirus. Cuando se usa una combinación de ADN, ácidos nucleicos auxiliares y un ARN replicón, estas moléculas pueden ser introducidas en momentos diferentes usando técnicas diferentes. La diferencia en la temporización puede proporcionar un periodo de tiempo para la recuperación de las células, y puede permitir también la optimización de las diferentes cinéticas de expresión de un ADN vector en comparación con un ARN vector. La temporización puede ser de 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ó 24 horas entre la introducción de cada molécula de ácido nucleico en las células. La introducción de ADN auxiliar o ADNs auxiliares mediante un medio diferente y previamente a la electroporación del ARN replicón (y ARN auxiliar, como sea apropiado) no tiene efectos nocivos considerables sobre la eficiencia de la electroporación de ARN.

*Transfección de ADN auxiliares**Mediada por lípidos*

5 Las células 293T, VERO o DF1 son transfectadas primero con el ADN auxiliar mediante lipofección usando Fegene<sup>®</sup>6 (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN). Las células son incubadas en presencia de Fugene y ADN en medio que contiene FBS al 10% durante 1 a 24 horas. Después de la incubación, son lavadas con PBS y son recolectadas mediante tripsinización.

10 *Electroporación*

La transfección de ADN en células Vero usando lípidos catiónicos disponibles comercialmente, tales como FuGene y Lipofectamina, es típicamente ineficiente (eficiencia de ~ 1%). Aunque estos métodos pueden ser suficientes para ciertas aplicaciones, la electroporación de ADNs auxiliares en células Vero es un enfoque alternativo preferente. Varios parámetros del procedimiento de electroporación pueden ser optimizados para mejorar la eficiencia de la entrada de ADN en las células Vero.

Por ejemplo, es preferente usar construcciones de ADN purificado. Por ejemplo, un ADN plásmido que contiene un gen bajo el control de un promotor de CMV es aislado primero usando un sistema maxiprep de alta pureza (por ejemplo, Qiagen<sup>®</sup>; Promega Corporation, Madison, WI). Dicho ADN purificado inicialmente preferentemente es purificado adicionalmente mediante extracción de fenol en presencia de bromuro de etidio y sal alta (referencia: Stemmer, WP, Biotechniques. 1991 Junio; 10(6):276). Este ADN purificado adicionalmente es resuspendido en agua libre de nucleasa previamente a la electroporación.

25 Otra etapa de optimización implica que las condiciones de cultivo para las células Vero pueden ser optimizadas para la electroporación de ADN. Las células Vero son cultivadas inicialmente en medio EMEM y crecen hasta la fase log tardía, a continuación son recolectadas mediante tripsinización, son lavadas dos veces con Invitrus<sup>®</sup> (Cell Culture Technologies GMBH, Zurich, Suiza), y son resuspendidas en 800  $\mu$ l de medio Invitrus.

30 Estas células bañadas en Invitrus son combinadas con una cantidad optimizada de ADN purificado (típicamente, las concentraciones están en el intervalo de 10  $\mu$ g a 200  $\mu$ g) y a continuación son transferidas a una cubeta con hueco de 0,4 cm<sup>2</sup>. Las electroporaciones son realizadas usando un dispositivo Biorad Gene Pulser<sup>®</sup> (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA), con cuatro pulsos a 50  $\mu$ F, sobre un intervalo de voltajes (500-700 V). Después de la electroporación, las células Vero son sembradas en placas de 6 pocillos y son incubadas durante 24 horas a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%.

35 En la determinación de los parámetros optimizados, la expresión de la proteína es analizada primero a las 16 y 23 horas post-electroporación. El porcentaje de células transfectadas, variando los parámetros anteriores, están en el intervalo de 1%-40%; un ejemplo de un conjunto de parámetros optimizados es: 150  $\mu$ g de ADN plásmido purificado y pulsando cuatro veces a 650 V, 50  $\mu$ F. Además, típicamente hay un incremento del 5-10% adicional en la expresión entre las 17 y las 23 horas post-electroporación.

40 La eficiencia de la electroporación puede ser mejorada también sincronizando las células Vero en una fase específica del ciclo celular. En un ejemplo, las células son sincronizadas en la fase G2/M con afidicolina (1 mg/ml) previamente a la electroporación (véase Golzio, M, Biochem Biophys Acta. 2002 Junio 13:1563(1-2):23-8). Estas células sincronizadas son manipuladas, tal como se ha descrito anteriormente, y son combinadas con 50  $\mu$ g de ADN plásmido previamente a la electroporación. En este ejemplo, las células tratadas con afidicolina muestran un factor de incremento de dos en el porcentaje de células transfectadas, en comparación con las células no tratadas (no sincronizadas).

50 *Electroporación de ARN replicón de alfavirus*

Después de la introducción de los ADNs auxiliares de la presente invención,  $1,2 \times 10^7$  células son electroporadas a continuación en presencia de un ARN replicón y ARN auxiliares apropiados (si se requieren) bajo las condiciones siguientes: 450 V (293T) ó 850 V (VERO y DF1) y 25  $\mu$ F en cubetas de electroporación con hueco de 0,4 cm (pulsos 3X con 4 segundos entre pulsos). A continuación, se permite que las células electroporadas se recuperen durante 10 minutos, antes de sembrarlas en 25 ml de medio que contiene FBS al 10%.

60 Cuando se usan combinaciones ARN replicón y ARN auxiliar, todos los ARNs pueden ser co-electroporados en la célula auxiliar al mismo tiempo. Los métodos para la electroporación de ARN son los descritos anteriormente. En una realización alternativa, cuando se introducen los ADNs auxiliares en la célula auxiliar mediante electroporación, el ARN replicón puede ser co-electroporado con los ADN auxiliares.

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula de ADN recombinante para expresar proteínas estructurales de alfavirus que comprende un promotor para dirigir la transcripción de ARN a partir de una secuencia de ADN ligada operativamente a una secuencia de ADN que comprende una secuencia codificadora de poliproteína estructural de alfavirus completa, con la condición de que la secuencia de ADN no codifique las secuencias de reconocimiento de replicación 5' o 3' alfavirales o un promotor subgenómico de alfavirus.
- 10 2. La molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1, en la que las proteínas estructurales de alfavirus son seleccionadas de entre el grupo que comprende proteínas estructurales de VEE, Sindbis, S.A.AR 86, virus de la selva de Semliki y virus del río Ross.
- 15 3. La molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1, en la que la secuencia codificadora de poliproteína estructural de alfavirus comprende una o más mutaciones atenuantes.
4. Célula auxiliar que produce una partícula replicón de alfavirus infecciosa y sin capacidad de replicación que comprende, en una célula permisiva a alfavirus,
- 20 (i) una molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1, 2 ó 3; y
- (ii) un ARN replicón de alfavirus que codifica al menos un ARN heterólogo.
- 25 5. Método de producción de partículas replicón de alfavirus infecciosas y sin capacidad de replicación, que comprende introducir en una población de células (i) la molécula de ADN recombinante según la reivindicación 1, 2, ó 3; y (ii) un ARN replicón de alfavirus que codifica al menos un ARN heterólogo, bajo condiciones en las que se producen partículas replicón de alfavirus infecciosas y sin capacidad de replicación.
- 30 6. El método según la reivindicación 5, en el que la molécula de ADN recombinante y/o el ARN replicón son introducidos en la población de células mediante electroporación.
7. Método de producción de partículas replicón de alfavirus infecciosas y sin capacidad de replicación, que comprende introducir en una población de células,
- 35 (i) una o más moléculas de ADN recombinante para expresar las proteínas estructurales de alfavirus que comprenden un promotor para dirigir la transcripción de ARN a partir de una secuencia de ADN ligada operativamente a una secuencia de ADN que codifica al menos una secuencia codificadora de proteína estructural de alfavirus, con la condición de que la secuencia de ADN no codifique las secuencias de reconocimiento de replicación 5' o 3' alfavirales o un promotor subgenómico de alfavirus;
- 40 (ii) una o más moléculas de ADN recombinante para expresar proteínas estructurales de alfavirus que comprenden un promotor para dirigir la transcripción de ARN a partir de una secuencia de ADN ligada operativamente a una secuencia de ADN que codifica al menos una secuencia codificadora de proteína estructural de alfavirus no presente en al menos una secuencia codificadora de proteína estructural de alfavirus de la primera molécula de ADN recombinante, con la condición de que la secuencia de ADN no codifique las secuencias de reconocimiento de replicación 5' o 3' alfavirales o un promotor subgenómico de alfavirus, en las que la primera y la segunda molécula de ADN recombinante juntas codifican todas las proteínas estructurales de alfavirus; y
- 45 (iii) un ARN replicón de alfavirus que codifica al menos un ARN heterólogo, bajo condiciones en las que la primera y la segunda moléculas de ADN recombinante son expresadas a partir de plásmidos autónomos, mediante los cuales se producen partículas replicón de alfavirus infecciosas y sin capacidad de replicación.
- 50 8. El método según la reivindicación 7, en el que la proteína estructural de alfavirus de una o más moléculas de ADN recombinante de (i) es seleccionada de entre el grupo que comprende una proteína estructural de VEE, Sindbis, S.A.AR 86, virus de la selva de Semliki y virus del río Ross.
- 55 9. El método según la reivindicación 7, en el que la proteína estructural de alfavirus de una o más moléculas de ADN recombinante de (ii) es seleccionada de entre el grupo que comprende proteína estructural de VEE, Sindbis, S.A.AR 86, virus de la selva de Semliki y virus del río Ross.
- 60 10. El método según la reivindicación 7, en el que la secuencia codificadora de proteína estructural de alfavirus de la una o más moléculas de ADN recombinante de (i) y/o la una o más moléculas de ADN recombinante de (ii) comprenden una o más mutaciones atenuantes.
- 65 11. El método según la reivindicación 7, en el que la una o más moléculas de ADN recombinante de (i) y la una o más moléculas de ADN recombinante de (ii) son introducidas en la población de células mediante electroporación.

# ES 2 330 202 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> AlphaVax, Inc.  
Jonathan F. Smith  
Kurt I. Kamrud  
Jonathan O. Rayner  
Sergey A. Dryga  
Ian J. Caley
- 10 <120> SISTEMAS VECTORES BASADOS EN REPLICONES DE ALFAVIRUS
- <130> 01113.0002P1
- 15 <140> No asignado  
<141> 2002-09-06
- 20 <150> 60/317,722  
<151> 2001-09-06
- <160> 49
- 25 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1  
<211> 31
- 30 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
35 <223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética
- <400> 1
- 40 ctagctagct atgtcactag tgaccacat g 31
- <210> 2  
<211> 27
- 45 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
50 <223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética
- <400> 2
- 55 gggccctcaa ttatgtttct ggttgg 27
- <210> 3  
<211> 53
- 60 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
65 <223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética

## ES 2 330 202 T3

	<400> 3		
	gcagagctgg tttagtgaac cgtataggcg gcgcatgaga gaagcccaga cca		53
5	<210> 4		
	<211> 26		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética		
15	<400> 4		
	gctagcgctc ttcctttt ttttt		26
20	<210> 5		
	<211> 29		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética		
30	<400> 5		
	gctctagaat gtccecgtc cagccaatg		29
35	<210> 6		
	<211> 52		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética		
45	<400> 6		
	gcgtcgacgt ctggccata gcggccgagg ttacagacac atggtgtca ct		52
50	<210> 7		
	<211> 91		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética		
60	<400> 7		
	<b>cggtcggca tggcatctcc acctcctcgc ggtccgacct gggcatccga aggaggacgt</b>		<b>60</b>
65	<b>cgccactcg gatggctaag ggagagctcg c</b>		<b>91</b>
	<210> 8		

## ES 2 330 202 T3

<211> 99  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
5 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética

10 <400> 8  
          **tcgagcgcgc tctcccttag ccataccgagt ggacgacgtc ctcccttcgga tgcccaggtc**       60  
          **ggaccgcgcg gaggtggaga tgccatgccg acccgggcc**                               99

15 <210> 9  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
20 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética

25 <400> 9  
          tagttattaa tagtaatcaa ttacgg                                                       26

30 <210> 10  
<211> 53  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
35 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética

40 <400> 10  
          tggctcgggc ttctctcatg cgccgcctat acggttcaact aaaccagctc tgc                               53

45 <210> 11  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
50 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética

55 <400> 11  
          ggcgcgccgt cctccgatcg ttgcagaag                                                       30

60 <210> 12  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
65 <220>

## ES 2 330 202 T3

	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
	<400> 12	
5	ggcgcgcctc cgcaaccgc gtatacatcc tggtaa	36
	<210> 13	
10	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
	<400> 13	
20	ggcgcgccat gtcactagtg accacatgt g	31
	<210> 14	
25	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
	<400> 14	
35	ctcgtaggcg ccggcgcctg cgg	23
	<210> 15	
	<211> 29	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
	<400> 15	
50	ggcgcgcaa ttcgccctc ctcctccc	29
	<210> 16	
	<211> 29	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
	<400> 16	
65	ggcgcgcctt atcatcgtgt tttcaaag	29
	<210> 17	

## ES 2 330 202 T3

	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
10	<400> 17	
	gctagcaatt cgcgccctct ccctccc	27
15	<210> 18	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
25	<400> 18	
	gctagcttat catcgtgttt ttcaaag	27
30	<210> 19	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
40	<400> 19	
	cgacgcgtat gttcccgttc cagccaatg	29
45	<210> 20	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
55	<400> 20	
	gcacgcgttt acagacacat ggtggtcact	30
60	<210> 21	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
65	<220>	

## ES 2 330 202 T3

	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
	<400> 21	
5	cctgccatgg tataaatggt cccgttccaa ccaatg	36
	<210> 22	
10	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética.	
	<400> 22	
20	cctgccatgg ccccggtcca accaatg	27
	<210> 23	
25	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
	<400> 23	
35	gtctagaatg ttcccggtcc aaccaatg	28
	<210> 24	
40	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
	<400> 24	
50	cgggatcccc attgctcgca gttctcgg	29
	<210> 25	
55	<211> 62	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
	<400> 25	
65	cgggatccga aaacctgtat tttcagggca tgtcactagt gaccaccatg tgtctgctcg cc	60 62

## ES 2 330 202 T3

	<210> 26	
	<211> 26	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
10	<400> 26	
	cgatatctca attatgttcc tgggtg	26
15	<210> 27	
	<211> 28	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
25	<400> 27	
	gtctagaatg tcctagtga ccaccatg	28
30	<210> 28	
	<211> 28	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
40	<400> 28	
	gcgctagcgt caattatggt tctgggtg	28
45	<210> 29	
	<211> 28	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
55	<400> 29	
	gtctagaatg ttccgttcc aaccaatg	28
60	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia Artificial	

## ES 2 330 202 T3

	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
5	<400> 30	
	caatcgcegc gaggctctatg	20
10	<210> 31	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
20	<400> 31	
	tttcggaccg tctctacggt ggtcctaaat agtc	34
25	<210> 32	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
35	<400> 32	
	ctggtcggat cattgggccc	20
40	<210> 33	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
50	<400> 33	
	cgggatccat gcggtttgat gcgggtgcat acatc	35
55	<210> 34	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
65	<400> 34	
	gctctagatt agccgtagag agttataggg g	31

## ES 2 330 202 T3

	<210> 35		
	<211> 30		
	<212> ADN		
5	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética		
10	<400> 35		
	tggcgcgcgcg ctcggaattc ccctctccc		30
15	<210> 36		
	<211> 29		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética		
25	<400> 36		
	aggcgcgcct tctatgtaag cagcttgcc		29
30	<210> 37		
	<211> 28		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética		
40	<400> 37		
	ccgggaaaac agcattccag gtattaga		28
45	<210> 38		
	<211> 73		
	<212> ADN		
50	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética		
55	<400> 38		
	tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttgaaat attaaaaaca		60
60	aaatccgatt cgg		73
	<210> 39		
	<211> 29		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia Artificial		

## ES 2 330 202 T3

	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética		
5	<400> 39		
	gacgggcccc ttgccttctg tagcgacac		29
10	<210> 40		
	<211> 29		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética		
20	<400> 40		
	gacgggcccga gttccaggt cagggtcgc		29
25	<210> 41		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética		
35	<400> 41		
	gacgggcccc cttcatttct ttgtccaatt cct		33
40	<210> 42		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética		
50	<400> 42		
	gacgggccct gcatacttat acaatctgtc cgga		34
55	<210> 43		
	<211> 35		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
60	<220>		
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética		
65	<400> 43		
	gacgggcccc ggacagatac aatgatactt gtgct		35

## ES 2 330 202 T3

	<210> 44	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
10	<400> 44	
	gacgggccccg ccagatgcga aaacgctctg	30
15	<210> 45	
	<211> 30	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
25	<400> 45	
	gacgggccccg ccagatgcga aaacgctctg	30
30	<210> 46	
	<211> 29	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
40	<400> 46	
	gacgggcctt acctcaaaact gcgggaagc	29
45	<210> 47	
	<211> 32	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética	
55	<400> 47	
	gacgggcctt tttggtagg taattgtct gg	32
60	<210> 48	
	<211> 23	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia Artificial	

## ES 2 330 202 T3

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética

5 <400> 48  
gacgggcccc tataactctc tac 23

10 <210> 49  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial; NOTA = Construcción Sintética

20 <400> 49  
gcaacgcggg gaggcagaca 20

25

30

35

40

45

50

55

60

65