

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 344**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2004 E 04757890 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 1608762**

54 Título: **Replicones de alfavirus mejorados y constructos cooperadores**

30 Prioridad:

20.03.2003 US 456196 P

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

07.04.2014

73 Titular/es:

**ALPHAVAX, INC. (100.0%)
P.O. BOX 110307, 2 TRIANGLE DRIVE
RESEARCH TRIANGLE PARK, NC 277, US**

72 Inventor/es:

**SMITH, JONATHAN, F.;
KAMRUD, KURT y
RAYNER, JON, O.**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 453 344 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

Replicones de alfavirus mejorados y constructos cooperadores.

5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con constructos mejorados para y con métodos para preparar partículas de alfavirus recombinantes.

10 Antecedentes de la invención

En eucariotas, se han desarrollado en las células dos mecanismos distintos para iniciar la traducción. En uno de ellos, la estructura metil-7-guanosina (5') pppN presente en el terminal 5' del ARNm (el "cap") se reconoce por el factor de iniciación eIF4F, que está compuesto por eIF4E, eIF4G y eIF4A. La formación de este "complejo de pre-iniciación" requiere, entre otros factores, la acción concertada del factor de iniciación eIF2, responsable de la unión al iniciador ARNt -Met_i, y eIF3, que interactúa con la subunidad ribosomal 40S (Hershey & Merrick. *Translational Control of Gene Expression*, págs. 33-88, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 2000).

En el mecanismo alternativo, la iniciación de la traducción ocurre internamente en el transcripto y está mediada por un elemento de la secuencia interna de entrada al ribosoma (IRES) que recluta la maquinaria de traducción hacia un codón de iniciación interno en el ARNm con la ayuda de factores de acción *trans* (Jackson. *Translational Control of Gene Expression*, págs. 127-184, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 2000). Elementos IRES se han encontrado en numerosos transcriptos a partir de los virus que infectan a las células de vertebrados, invertebrados, o de plantas, así como en transcriptos a partir de genes de vertebrados e invertebrados.

Durante muchas infecciones virales, así como en otras condiciones de estrés celular, cambios en el estado de fosforilación de eIF2, que reducen los niveles del complejo ternario eIF2 -GTP -ARNt -Met_i, resultan en la inhibición total de la síntesis de proteínas. Al contrario, el cierre específico de la iniciación cap-dependiente depende de la modificación de la funcionalidad de eIF4F (Thompson & Sarnow. *Current Opinion in Microbiology* 3:366-370 (2000)).

Elementos IRES desvían la inhibición de la traducción cap-dependiente; así la traducción dirigida por un elemento IRES se denomina "cap-independiente." La iniciación de la traducción impulsada por IRES prevalece durante muchas infecciones virales, tales como, por ejemplo, la infección picornaviral (Macejak & Sarnow. *Nature* 353:90-94 (1991)). Bajo estas circunstancias, la iniciación cap-dependiente se inhibe o compromete severamente debido a la presencia de pequeñas cantidades de eIF4F funcional. Esto es causado por escisión o la pérdida de solubilidad de eIF4G (Gradi y otros *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95:11089-11094 (1998)); desfosforilación de 4E-BP (Gingras y otros *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93:5578-5583 (1996)) o escisión de la proteína de unión a poli(A) (PABP) (Joachims y otros *Journal of Virology* 73:718-727 (1999)).

Los vectores de alfavirus que expresan un ácido nucleico de interés (NOI) a niveles variables se han descrito. Todos los ejemplos describen la modificación de los genes de proteínas no estructurales de alfavirus o del promotor 26S (subgenómico) para regular la replicación del vector o transcripción a partir del promotor subgenómico. Los ejemplos incluyen mutaciones en los genes de proteínas no estructurales que aumentan o disminuyen la transcripción del ARN subgenómico o alteran la replicación del ARN genómico, lo que resulta en la expresión del NOI modificado. El control de la expresión de proteínas a partir de un vector de alfavirus, en el nivel de la traducción del ARNm subgenómico, no se ha descrito previamente.

Rayner JO y otros (*Rev Med Virol.* 2002 Sep-Oct;12(5):279-96) describen vectores de expresión que se diseñaron a partir de al menos tres alfavirus en los que la región del gen de la proteína estructural se reemplazó por genes heterólogos y se mostró que expresa altos niveles de la proteína heteróloga en las células cultivadas. Estos vectores de ARN (replicones) son capaces de autoreplicarse, pero no se empacan en partículas tipo-virus a menos que las proteínas estructurales sean proporcionadas en trans, y por lo tanto son incapaces de extenderse de las células infectadas a no infectadas.

Pushko P y otros (*Virology.* 1997 Dic 22;239(2):389-401) describen los sistemas replicón- cooperador del virus de la encefalitis equina venezolana atenuado, y la expresión de los genes heterólogos *in vitro* e inmunización contra patógenos heterólogos *in vivo*.

La presente invención proporciona vectores de alfavirus replicones y cooperadores diseñados para controlar la expresión de una o más secuencias heterólogas de ácido nucleico en el nivel de traducción de proteínas a través de un mecanismo cap-independiente bajo la dirección de un elemento IRES.

Resumen de la invención

65 En una modalidad, la presente invención proporciona un ácido nucleico replicón recombinante que comprende:

- (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de reconocimiento de la replicación 5' del alfavirus;
(b) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína no estructural de alfavirus;
(c) un casete de promotor subgenómico-IRES-ácido nucleico de interés (NOI) de alfavirus, que está en la orientación de 5' a 3'; y
(d) un ácido nucleico que codifica una secuencia de reconocimiento de la replicación 3' del alfavirus.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un ácido nucleico cooperador recombinante que comprende:

- (a) una secuencia de reconocimiento de la replicación 5' del alfavirus;
(b) un casete promotor subgenómico-IRES-NOI heterólogo de alfavirus, que está en la orientación 5' a 3', en donde el NOI codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus; y
(c) una secuencia de reconocimiento de la replicación 3' del alfavirus.

Se proporciona además en la presente descripción una partícula de alfavirus que comprende un ARN replicón de alfavirus que comprende el ácido nucleico replicón recombinante de esta invención. En una modalidad adicional, se proporciona en la presente descripción una población de partículas de alfavirus infecciosas, defectuosas, en donde cada partícula contiene un ARN replicón de alfavirus que comprende un ácido nucleico replicón recombinante de esta invención. En algunas modalidades, la invención proporciona una población de partículas de alfavirus, infecciosas, defectuosas en donde cada partícula contiene un ARN replicón de alfavirus que comprende un ácido nucleico replicón recombinante de esta invención, y la población no tiene virus competente de replicación detectable, como se mide mediante el paso en cultivo celular. En modalidades específicas, las partículas de esta invención pueden contener uno o más mutaciones atenuantes.

Adicionalmente, se incluyen las composiciones farmacéuticas, que comprenden las partículas y poblaciones de esta invención en un portador farmacéuticamente aceptable.

En otras modalidades, la presente invención proporciona un método para preparar partículas de alfavirus defectuosas infecciosas, que comprenden:

- a) introducir en una célula lo siguiente:
- (i) un ácido nucleico replicón recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, y
(ii) uno o más ácidos nucleicos cooperadores que codifican proteínas estructurales de alfavirus, en donde uno o más ácido nucleico cooperador produce todas las proteínas estructurales de alfavirus, y
- b) producir dichas partículas de alfavirus en la célula.

El método de esta invención puede comprender además la etapa de recoger dichas partículas de alfavirus de las células.

En algunas modalidades, el ácido nucleico cooperador puede ser además un ácido nucleico replicón recombinante de esta invención. Por ejemplo, un ácido nucleico recombinante de esta invención puede comprender, como un ácido nucleico heterólogo y/o adicionalmente un ácido nucleico heterólogo, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína estructural de alfavirus o más de una proteína estructural de alfavirus. En tales modalidades, el ácido nucleico replicón recombinante se considera a un ácido nucleico cooperador replicón recombinante, que puede estar presente en una célula con otros ácidos nucleicos cooperadores y/u otros ácidos nucleicos recombinantes de esta invención.

Así, en una modalidad específica, el ácido nucleico replicón recombinante de esta invención codifica además una proteína estructural de alfavirus o más de una proteína estructural de alfavirus. Este ácido nucleico replicón recombinante puede introducirse en una población de células, junto con uno o más ácidos nucleicos cooperadores, tal que el ácido nucleico replicón recombinante y el ácido nucleico cooperador(es) producen todas las proteínas estructurales de alfavirus, y el ácido nucleico replicón recombinante se empaca dentro de las partículas en dichas células.

Adicionalmente, se proporcionan poblaciones y/o composiciones de esta invención para usar en la inducción de una respuesta inmune en un sujeto.

Breve descripción de las figuras

Figura 1 muestra una transferencia de tipo Northern del replicón espaciador-IRES de ARN subgenómicos.

65

Descripción detallada de la invención

Como se utiliza en la presente, "uno," "una" y "el/la" pueden significar uno o más de uno, en dependencia del contexto en que se usa. Según los ejemplos, "una célula" puede significar una célula o múltiple células; y "un ácido nucleico heterólogo" puede significar un ácido nucleico heterólogo o múltiples ácidos nucleicos heterólogos.

5 La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente e inesperado de que la transcripción de un ácido nucleico y la traducción del ácido nucleico pueden estar desacopladas. Para los propósitos de esta invención, el término "transcripción" incluye la producción de ARN de un promotor subgenómico de alfavirus de un ácido nucleico replicón recombinante, que puede ser en sí una molécula de ARN. Es decir, el promotor subgenómico en una molécula de ARN replicón recombinante de esta invención puede dirigir la transcripción de un ARN mensajero que codifica un NOI heterólogo. Por otra parte, el ácido nucleico replicón recombinante se puede "replicar", es decir, copiar a partir de la secuencia de reconocimiento de la replicación 5' a través de la secuencia de reconocimiento de replicación.

10 En una modalidad, la presente invención proporciona un ácido nucleico replicón recombinante que comprende:

- 15 (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de reconocimiento de la replicación 5' del alfavirus;
 (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del alfavirus no estructural;
 20 (c) un casete de promotor subgenómico-IRES-ácido nucleico heterólogo de interés (NOI) de alfavirus, que está en la orientación de 5' a 3'; y
 (d) un ácido nucleico que codifica una secuencia de reconocimiento de la replicación 3' del alfavirus.

25 En algunas modalidades, el ácido nucleico replicón recombinante comprende además una señal de empaque de alfavirus tal que el replicón puede empacarse en las partículas. En modalidades adicionales, el ácido nucleico replicón recombinante puede comprender una secuencia espaciador de ácido nucleico que puede ubicarse corriente arriba de un elemento IRES.

30 Se entiende que en varias modalidades, los elementos del ácido nucleico replicón recombinante de esta invención pueden presentarse en el orden listado en la presente descripción y/o presente en cualquier orden. Así por ejemplo, en una modalidad, la presente invención proporciona un ácido nucleico replicón recombinante que comprende, en el siguiente orden:

- 35 (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de reconocimiento de la replicación 5' del alfavirus;
 (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del alfavirus no estructural;
 (c) un casete de promotor subgenómico-IRES-ácido nucleico heterólogo de interés (NOI) de alfavirus, que está en la orientación de 5' a 3'; y
 (d) un ácido nucleico que codifica una secuencia de reconocimiento de la replicación 3' del alfavirus.

40 Como se utiliza en la presente, una "secuencia de reconocimiento de la replicación del 5' alfavirus" y "secuencia de reconocimiento de la replicación del 3' alfavirus" son secuencias 5' y 3' (las designaciones 5' y 3' que refieren a su ubicación en el ácido nucleico de alfavirus), que controlan la replicación de un genoma de alfavirus. En algunas modalidades, ya sea una o ambas secuencias de reconocimiento 5' y 3' de la replicación de alfavirus se pueden trunca en cualquier extremo, y proporcionar que su función en la replicación de un genoma de alfavirus permanezca intacta.

45 Como se utiliza en la presente además, "una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína no-estructural de alfavirus" incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una, y posiblemente más de una, proteína no-estructural de alfavirus. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de este tipo de esta invención puede ser una secuencia contigua de nucleótidos que codifica proteínas no-estructurales de alfavirus nsp1, nsp2, nsp3 y nsp4, una secuencia contigua de nucleótidos que codifica proteínas no-estructurales de alfavirus nsp1, nsp2 y nsp3, un ácido nucleico contiguo que codifica proteínas no-estructurales de alfavirus nsp2, nsp3 y nsp4, un ácido nucleico contiguo que codifica proteínas no-estructurales de alfavirus nsp1 y nsp2, un ácido nucleico contiguo que codifica proteínas no-estructurales de alfavirus nsp3 y nsp 4, un ácido nucleico contiguo que codifica proteínas no-estructurales de alfavirus nsp2 y nsp3, un ácido nucleico que codifica la proteína no-estructural de alfavirus nsp1, un ácido nucleico que codifica la proteína no-estructural de alfavirus nsp2, un ácido nucleico que codifica la proteína no-estructural de alfavirus nsp3, un ácido nucleico que codifica la proteína no-estructural de alfavirus nsp4 y/o cualquier combinación y/u orden de estos, tal que el ácido nucleico replicón recombinante comprende las secuencias de nucleótidos que codifican en total nsp1, nsp2, nsp3 y nsp4.

50 En modalidades particulares, el ácido nucleico replicón recombinante de esta invención puede comprender el ácido nucleico que codifica una o más proteínas no-estructurales de alfavirus en cualquier combinación y en cualquier ubicación en relación a la otra, tal que el ácido nucleico replicón recombinante comprende las secuencias de nucleótidos que codifican en total nsp1, nsp2, nsp3 y nsp4. Por ejemplo, un ácido nucleico replicón recombinante de esta invención puede comprender, en el siguiente orden: (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de reconocimiento de la replicación del 5' alfavirus, (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica la

proteína no-estructural de alfavirus nsp1, nsp2 y nsp3, (c) un casete de promotor subgenómico-IRES-ácido nucleico heterólogo de interés (NOI) de alfavirus en la orientación 5' a 3'; (b2) otra secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína no-estructural de alfavirus nsp4, y (d) un ácido nucleico que codifica una secuencia de reconocimiento de la replicación del 3' alfavirus.

Como se utiliza además en la presente, un "promotor subgenómico de alfavirus," "promotor subgenómico," o "promotor 26S" es un promotor presente en un genoma de alfavirus que dirige la transcripción de un mensaje subgenómico en un proceso de replicación normal de alfavirus. El promotor subgenómico de alfavirus se puede truncar (por ejemplo, producir un promotor subgenómico de alfavirus mínimo y/o modificar tal que su actividad se reduce, mantiene o aumenta, de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

Los ácidos nucleicos recombinantes de esta invención pueden comprender un elemento de la secuencia interna de entrada al ribosoma (IRES), que dirige la traducción de un ácido nucleico en una proteína mediante un mecanismo cap-independiente, como se describe en la presente descripción y como se conoce bien en la técnica. En particular en los ácidos nucleicos replicones recombinantes de la presente invención, el control de la expresión de ácido nucleico al nivel de la traducción se lleva a cabo introduciendo un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) corriente abajo de un promotor subgenómico 26S de alfavirus y de la secuencia codificante a se traducida. El elemento IRES se posiciona tal que dirige la traducción del ARNm, minimizando, limitando o evitando por lo tanto, la iniciación de la traducción del ARNm a partir de la estructura metil-7-guanosina (5')pppN presente en el extremo 5' del ARNm subgenómico (el "cap"). Este "IRES-dirigido," no requiere de traducción cap-independiente o resulta en cualquier modificación significativa de los genes de proteínas no estructurales de alfavirus que pueden alterar la replicación y la transcripción.

Los vectores alfavirus diseñados para controlar el nivel de expresión de un ácido nucleico heterólogo sin modular (por ejemplo, alterar, desconcertar, perturbar, desestabilizar, aumentar, mejorar, reducir, minimizar) la replicación del genoma o transcripción subgenómica tienen diversas ventajas sobre los diseños de vectores anteriores. Primero, la modulación de la replicación del genoma puede afectar negativamente a la generación de VPR mediante la limitación del número de ARN genómicos disponibles para empaquetar en las partículas. Segundo, la modulación de la transcripción subgenómica mediante la alteración (por ejemplo, por truncamiento, delección, adición y/o sustitución) el promotor 26S puede alterar la replicación del ARN genómico, lo que resulta de nuevo en la limitación del número de ARNs genómicos disponibles para empaquetar en las partículas. Tercero, la replicación del alfavirus induce una respuesta de estrés en las células que pueden resultar en la traducción cap-dependiente reducida de los ARNm. El intercambio de la traducción cap-dependiente de un ARNm subgenómico de alfavirus al mecanismo de cap-independiente proporcionado por un elemento IRES minimiza este efecto negativo sobre la expresión de NOI.

Un elemento IRES de la presente invención puede incluir, pero sin limitarse a, elementos IRES virales de picornavirus, por ejemplo, poliovirus (PV) o el enterovirus humano 71, por ejemplo, cepas 7423/MS/87 y BrCr de este; de virus de la encefalomiocarditis (EMCV); de virus de la fiebre aftosa (FMDV); de flavivirus, por ejemplo, el virus de la hepatitis C (HCV); de pestivirus, por ejemplo, el virus de la peste porcina clásica (CSFV); de retrovirus, por ejemplo, virus de la leucemia murina (MLV); de lentivirus, por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV); de elementos IRES del ARNm celular tales como aquellos a partir de los factores de iniciación de la traducción, por ejemplo, eIF4G o DAP5; de factores de transcripción, por ejemplo, c-Myc (Yang y Samow, *Nucleic Acids Research* 25: 2800-2807 (1997)) o factor NF- κ B-represivo (NRF); de factores de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblasto (FGF-2) y factor de crecimiento derivado de plaqueta B (PDGF B); de genes homeóticos, por ejemplo, *Antennapedia*; de proteínas de supervivencia, por ejemplo, inhibidor de apoptosis enlazado a X (XIAP) o Apaf-1; de chaperonas, por ejemplo, proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina BiP (Martinez-Salas y otros, *Journal of General Virology* 82: 973-984, (2001)), de virus de plantas, así como cualquiera de otros elementos IRES conocidos actualmente o posteriormente identificados.

En algunas modalidades, el elemento IRES de esta invención puede derivarse a partir de, por ejemplo, virus de la encefalomiocarditis (EMCV, # de acceso en el GenBank NC001479), virus de parálisis del grillo (# de acceso en el GenBank AF218039), virus de *Drosophila* C (# de acceso en el GenBank AF014388), virus intestinal de *Plautia stali* (# de acceso en el GenBank AB006531), virus *Rhopalosiphum padi* (# de acceso en el GenBank AF022937), virus P Himetobi (# de acceso en el GenBank AB017037), virus de parálisis aguda de la abeja (# de acceso en el GenBank AF150629), virus de la celda real negra (# de acceso en el GenBank AF183905), virus de *Triatoma* (# de acceso en el GenBank AF178440), virus *Acyrtosiphon pisum* (# de acceso en el GenBank AF024514), virus infeccioso de flacherie (# de acceso en el GenBank AB000906), y/o virus Sacbrood (# de acceso en el GenBank AF092924). Adicionalmente, la presente invención proporciona un elemento IRES sintético, que puede diseñarse, de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica para imitar la función de los elementos IRES de origen natural (ver Chappell y otros *Proc Natl Acad Sci USA*. (2000) 97(4):1536-41.

En modalidades específicas, el elemento IRES puede ser un elemento IRES de insecto u otro elemento IRES no-mamífero que es funcional en la línea celular cooperadora elegida en particular para empacar las partículas recombinantes de alfavirus de esta invención, pero no puede ser funcional, o no puede ser mínimamente funcional, en una célula huésped diana. Los elementos IRES de virus de insectos han evolucionado para funcionar de manera

- 5 óptima dentro de las células de insectos y del mismo modo las secuencias IRES de virus de mamífero para funcionar de manera óptima en células de mamífero. Así, el control de la traducción se puede introducir en sistemas de vector replicón mediante la inserción de elementos IRES específicos de virus de insectos en los ARNs replicones. De esta manera, la traducción de NOIs heterólogos a partir de vectores replicón puede ser regulada (atenuada) en las células de mamífero y mejoradas en las células de insectos. Esto es útil para aquellos NOIs que son ya sea tóxicos a la célula de empaquetamiento o son perjudiciales para el proceso de empaquetamiento del alfavirus. Una manera alternativa de lograr este efecto es usar un elemento IRES de mamífero en el vector replicón que se empaqueta en un sistema de cultivo de células de insecto, evitando de ese modo además la traducción posiblemente significativa del NOI heterólogo durante el empaquetamiento. Sin estar ligado a una hipótesis o teoría en particular, los factores celulares y ambiente de cultivo pueden jugar un papel en la actividad y función de IRES. Por lo tanto, se prevé que los niveles adicionales de control/regulación de las diferentes especies de IRES en la misma célula se pueden lograr a través del suministro/eliminación de ciertos factores celulares o por los cambios en el ambiente de cultivo (por ejemplo, la temperatura) en la traducción preferentemente directa de un IRES en comparación con un segundo.
- 10
- 15 En algunas modalidades, el ambiente celular de la línea celular cooperadora o del empaquetamiento se puede alterar tal que una actividad específica de IRES es mejorada o reducida. Típicamente, los elementos IRES evolucionaron para funcionar en condiciones de estrés celular donde niveles aumentados de eIF-2alfa quinasas resultan en la traducción cap-dependiente reducida y un aumento recíproco en la traducción/actividad IRES-dependiente. Tales condiciones se pueden inducir artificialmente en un sistema de empaquetamiento celular para aumentar la expresión de elementos IRES seleccionados por una variedad de métodos, que incluyen pero sin limitarse a hipoxia, hipotermia, inanición nutricional/aminoácido, inducción de estrés ER (por ejemplo, usando Tapsigargina), inducción de interferón o elementos PKR (por ejemplo, usando poli IC), bloqueo de la síntesis dependiente de ARNt (por ejemplo, usando Edeine), u otros estresores de células generales conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, peróxido de hidrógeno y sorbitol.
- 20
- 25 En otras modalidades, se puede modular la traducción de la NOI dirigida por el elemento IRES, por ejemplo, mediante el uso de siARNs antisentido específicos del elemento/espaciador IRES o NOI que puede transfectarse en, o transducirse/expresarse transitoriamente en la célula de empaquetamiento por un número de métodos estándar conocidos en la técnica y descritos en la presente descripción.
- 30
- 35 Como otra alternativa, la expresión del NOI se puede modular además con el uso de pares de unión al ligando, por ejemplo, un elemento de ácido nucleico y una molécula (es decir, ligando) que se une a él (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos núm. 6,242,259), por ejemplo un ácido nucleico replicón recombinante que comprende: (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de reconocimiento de la replicación del 5' alfavirus, (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína no-estructural de alfavirus, (c) un promotor subgenómico de alfavirus, un elemento IRES, una secuencia de nucleótidos no-alfavirus que, cuando se une mediante un ligando altera la transcripción del ARN subgenómico y/o traducción del IRES, un ácido nucleico heterólogo, y (d) un ácido nucleico que codifica a secuencia de reconocimiento de la replicación del 3' alfavirus.
- 40
- 45 Como una modalidad específica, el ligando puede ser una proteína de unión de ARN (por ejemplo, la proteína de envoltura R17), una secuencia antisentido, un colorante (por ejemplo, colorantes Hoechst H33258 o H3342), y/o un antibiótico (por ejemplo tobramicina o kanamicina). Estos se pueden introducir o producir en las células de empaquetamiento mediante métodos conocidos por aquellos con experiencia en la técnica (ver patente de Estados Unidos núm. 6, 242, 259).
- 50
- 55 Como se utiliza en el contexto de la presente invención, una reducción ya sea de la transcripción del ARN subgenómico, o una reducción de la traducción de un NOI dirigido por el IRES, debido a la acción de un ligando de unión a una secuencia de nucleótidos no-alfavirus ubicados en estrecha proximidad al promotor subgenómico de alfavirus o IRES debe entenderse que se refiere a una disminución estadísticamente significativa de cualquier transcripción o traducción, respectivamente, en presencia del ligando seleccionado. En algunas modalidades, el nivel de cualquier transcripción de ARN subgenómico o traducción NOI dirigida por IRES en las células se reduce al menos 25%, 50%, 75%, o 90%, o 3 veces, 5 veces, o 10 veces en comparación con los niveles sin la presencia del ligando de unión. Una amplia variedad de ensayos que se conocen en la técnica se pueden utilizar para evaluar un nivel reducido de la transcripción o traducción, que incluyen por ejemplo, ensayos enzimáticos de un gen reportero, transferencias de tipo Northern, etiquetado del ARN metabólico y similares.
- 60
- Los ácidos nucleicos replicones recombinantes de esta invención pueden comprender uno o más elementos IRES y en aquellas modalidades que comprenden dos o más elementos IRES, los elementos IRES pueden ser los mismos o pueden ser diferentes, en cualquier orden y/o combinación. En modalidades específicas, el ácido nucleico replicón recombinante puede comprender dos o más "casetes promotor-IRES-NOI heterólogos," en el que el promotor, IRES y NOI heterólogo en cada casete puede ser diferente o similar. Alternativamente, el ácido nucleico replicón recombinante puede codificar dos o más NOIs, uno de los cuales se controla por un "casete promotor-IRES," mientras que el otro NOI(s) se puede controlar por un promotor subgenómico solo o por un IRES solo.
- 65
- El ácido nucleico heterólogo de esta invención es un ácido nucleico que no está presente en el genoma de un alfavirus silvestre y/o no está presente en el genoma de un alfavirus silvestre en el mismo orden que existe en un

ácido nucleico replicón recombinante de esta invención. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el ácido nucleico heterólogo de esta invención puede codificar uno o más alfavirus de proteínas estructurales (por ejemplo, C, PE2/E2, E1, E3, 6K) y/o uno o más alfavirus de proteínas estructurales, adicionalmente de un ácido nucleico heterólogo. Cuando el ácido nucleico replicón recombinante de esta invención comprende el ácido nucleico que codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus, el ácido nucleico replicón recombinante puede funcionar como un ácido nucleico replicón recombinante cooperador en el ensamblaje de las partículas de alfavirus defectuosas e infecciosas, como se describe en la presente descripción.

El ácido nucleico heterólogo de esta invención puede codificar una proteína o péptido, que puede ser, pero sin limitarse a, un antígeno, un inmunógeno o polipéptido o péptido inmunogénico, una proteína de fusión, un péptido de fusión, un antígeno de cáncer, etc. Ejemplos de proteínas y/o péptidos codificados por el ácido nucleico heterólogo de esta invención incluyen, pero sin limitarse a, polipéptidos inmunogénicos y péptidos adecuados para proteger un sujeto contra una enfermedad, incluyendo, pero sin limitarse a enfermedades microbianas, bacterianas, protozoarias, parasitarias, y virales.

En algunas modalidades, por ejemplo, la proteína o péptido codificado por el ácido nucleico heterólogo puede ser un inmunógeno de ortomixovirus (por ejemplo, una proteína de virus de la influenza o péptido tales como la proteína de superficie hemaglutinina (HA) del virus de la influenza o la nucleoproteína del virus de la influenza, o una proteína o péptido del virus de la influenza equina), o un inmunógeno del virus de la parainfluenza, o un inmunógeno de metapneumovirus, o un inmunógeno del virus sincitial respiratorio, o un inmunógeno de rinovirus, un inmunógeno de lentivirus (*por ejemplo*, una proteína o péptido del virus de la anemia infecciosa equina, una proteína o péptido del virus de la inmunodeficiencia simia (SIV), o una proteína o péptido del virus de inmunodeficiencia humana (HIV), tales como la proteína de envoltura GP160 del HIV o VIS, proteínas de la matriz/cápsida de HIV o SIV, y los productos génicos de gag, pol y env de HIV o SIV). La proteína o péptido pueden ser además un inmunógeno de arenavirus (*por ejemplo*, proteína o péptido del virus de la fiebre de Lassa, tales como la proteína de la nucleocápsida del virus de la fiebre de Lassa y la glicoproteína de la envoltura de la fiebre de Lassa), un inmunógeno picornavirus (*por ejemplo*, una proteína o péptido del virus la enfermedad de pies y boca), un inmunógeno de poxvirus (*por ejemplo*, una proteína o péptido de vaccinia, tales como la proteína L1 o L8 de vaccinia), un inmunógeno de orbivirus (*por ejemplo*, una proteína o péptido de la enfermedad del virus equino africano), un inmunógeno de flavivirus (*por ejemplo*, una proteína o péptido del virus de la fiebre amarilla, una proteína o péptido del virus del Nilo Occidental, o una proteína o péptido del virus de la encefalitis japonesa), un inmunógeno de filovirus (*por ejemplo*, una proteína o péptido del virus de Ébola, o una proteína o péptido del virus de Marburg, tales como las proteínas NP y GP), un inmunógeno de bunyavirus (*por ejemplo*, proteínas o péptidos de RVFV, CCHF, y SFS), o un inmunógeno de coronavirus (*por ejemplo*, una proteína o péptido de coronavirus humano infeccioso, tales como la glicoproteína de envoltura del coronavirus humano, o una proteína o péptido del virus de la gastroenteritis porcina transmisible, o una proteína o péptido del virus de la bronquitis aviar infecciosa). La proteína o polipéptido codificado por el ácido nucleico heterólogo de esta invención pueden ser, además, un antígeno de la polio, antígeno de herpes (*por ejemplo*, antígenos de CMV, EBV, HSV) antígeno de paperas, antígeno del sarampión, antígeno de la rubéola, antígeno de la varicela, toxina botulínica, toxina diftérica u otro antígeno de la difteria, antígeno de la tos ferina, antígeno de hepatitis (*por ejemplo*, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Hepatitis D, o Hepatitis E), o cualquier otro antígeno de la vacuna conocido en la técnica.

Como se utiliza en la presente, "inducir una respuesta inmune" e "inmunizar un sujeto" incluye el desarrollo, en un sujeto, de una respuesta humoral y/o una celular a una proteína y/o polipéptido de esta invención (por ejemplo, un inmunógeno, un antígeno, un péptido inmunogénico, y/o uno o más epítopos). Un respuesta inmune "humoral", tal como este término es bien conocido en la técnica, se refiere a una respuesta inmune que comprende anticuerpos, mientras que una respuesta inmune "celular", tal como este término es bien conocido en la técnica, se refiere a una respuesta inmune que comprende linfocitos T y otras células blancas de la sangre, especialmente la respuesta inmunógeno-específica por células T citolíticas restringidas por HLA, es decir, "CTLs." Una respuesta inmune celular ocurre cuando los inmunógenos procesados, es decir, fragmentos de péptidos, se muestran en conjunción con las proteínas HLA del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que son de dos tipos generales, clase I y clase II. CTL restringidas por HLA clase I generalmente se unen a péptidos 9-mer y presentan aquellos péptidos en la superficie celular. Estos fragmentos de péptido en el contexto de la molécula de HLA de clase I se reconocen por proteínas receptoras de células T específicas (TCR) en los linfocitos T, lo que resulta en la activación de la célula T. La activación puede resultar en un número de consecuencias funcionales incluyendo, pero sin limitarse a la expansión del subconjunto de células T específicas que resultan de la destrucción de la célula que porta el complejo HLA -péptido directamente a través de eventos citotóxicos o apoptóticos o la activación de mecanismos no-destructivos, por ejemplo, la producción de interferón/citocinas. La presentación de inmunógenos vía proteínas de MHC de clase I típicamente estimula una respuesta CTL CD8 +.

Otro aspecto de la respuesta inmune celular involucra las respuestas de células T-restringidas por HLA clase II, que implica la activación de células T cooperadoras, que estimulan y focalizan la actividad de las células efectoras no específicas contra las células que exhiben los fragmentos de péptidos en asociación con las moléculas MHC en su superficie. Al menos dos tipos de células cooperadoras se reconocen: células T-cooperadoras 1 (Th1), que secretan las citocinas de interleucina 2 (IL-2) e interferón-gamma y células T cooperadoras 2 (Th2), que secretan las citocinas de interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6) y la interleucina 10 (IL-10). La presentación de

inmunógenos vía proteínas MHC Clase II típicamente induce una respuesta CTL CD4+ así como la estimulación de los linfocitos B, que conducen a una respuesta de anticuerpos.

5 Un "polipéptido inmunogénico," "péptido inmunogénico" o "inmunógeno" como se utiliza en la presente incluye cualquier péptido, proteína o polipéptido que induce una respuesta inmune en un sujeto y en ciertas modalidades, el polipéptido inmunogénico es adecuado para proporcionar algún grado de protección a un sujeto contra una enfermedad. Estos términos se pueden usar indistintamente con el término "antígeno."

10 En algunas modalidades, el inmunógeno de esta invención puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en uno o más "epítopos." Un "epítipo" es un conjunto de residuos de aminoácidos que se involucra en el reconocimiento por una inmunoglobulina particular. En el contexto de las células T, un epítipo se define como el conjunto de residuos de aminoácidos necesarios para el reconocimiento por las proteínas receptoras de células T y/o receptores de MHC. En una definición de sistema inmune, *in vivo* o *in vitro*, un epítipo se refiere a las características colectivas de una molécula, como por ejemplo, la estructura peptídica primaria, secundaria y/o terciaria, y/o carga, que junto forman un sitio reconocido por una inmunoglobulina, receptor de células T y/o molécula HLA. En el caso de un epítipo de célula B (anticuerpo), que es típicamente un mínimo de 3-4 aminoácidos, preferentemente al menos 5, en el intervalo hasta aproximadamente 50 aminoácidos. Preferentemente, los epítopos que inducen la respuesta humoral están entre 5 y 30 aminoácidos, por lo general entre 12 y 25 aminoácidos, y más comúnmente entre 15 y 20 aminoácidos. En el caso de un epítipo de células T, un epítipo incluye al menos 20 aproximadamente 7-9 aminoácidos, y para un epítipo de células T cooperadoras, al menos aproximadamente 12-20 aminoácidos. Típicamente, un epítipo de células T de este tipo incluirá entre aproximadamente 7 y 15 aminoácidos, por ejemplo, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos.

25 La presente invención puede emplearse para expresar un ácido nucleico que codifica un polipéptido inmunogénico en un sujeto (*por ejemplo*, para la vacunación) o para inmunoterapia (*por ejemplo*, para tratar un sujeto con cáncer o tumores). Así, en el caso de las vacunas, la presente invención proporciona de este modo una población y/o composición de esta invención para uso en inducir una respuesta inmune en un sujeto.

30 Se contempla además que los ácidos nucleicos, partículas, poblaciones y composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden emplear en los métodos para suministrar un NOI de interés a una célula, que puede ser una célula en un sujeto. Tales métodos pueden ser empleados para impartir un efecto terapéutico en una célula y/o un sujeto, de acuerdo con protocolos bien conocidos para la terapia génica.

35 Un "sujeto" incluye, pero no se limita a, animales de sangre caliente, por ejemplo, seres humanos, primates no-humanos, caballos, vacas, gatos, perros, cerdos, ratas, y ratones. La administración de las diversas composiciones de esta invención (por ejemplo, ácidos nucleicos, partículas, poblaciones, composiciones farmacéuticas) puede llevarse a cabo por cualquiera de diversas rutas diferentes. En modalidades específicas, las composiciones se pueden administrar por vía intramuscular, vía subcutánea, vía intraperitoneal, vía intradérmica, vía intranasal, intracraneal, vía sublingual, vía intravaginal, vía intrarectal, vía oral, o vía tópica. Las composiciones de la presente descripción se pueden administrar a través de un método de escarificación de la piel, o por vía transdérmica mediante un parche o líquido. Las composiciones se pueden entregar por vía subdérmica en forma de un material biodegradable que libera las composiciones durante un periodo de tiempo.

45 Las composiciones de esta invención se pueden usar de manera profiláctica para prevenir la enfermedad o terapéuticamente para tratar la enfermedad. Las enfermedades que se pueden tratar incluyen la enfermedad infecciosa causada por virus, bacterias, hongos o parásitos, y el cáncer. Las enfermedades crónicas que involucran la expresión de proteínas aberrantes o anormales o la sobre-expresión de las proteínas normales, se pueden tratar además, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de la esclerosis múltiple, apoplejía, etc.

50 Las composiciones de esta invención se pueden optimizar y combinar con otros regímenes de vacunación para proporcionar las más amplias (es decir, todos los aspectos de la respuesta inmune, incluyendo las características descritas anteriormente) respuestas celulares y humorales posibles. En ciertas modalidades, esto puede incluir el uso de estrategias de sensibilización-refuerzo heterólogas, en la que las composiciones de esta invención se usan en conjunto con una composición que comprende uno o más de los siguientes: inmunógenos derivados de un patógeno o tumor, inmunógenos recombinantes, ácidos nucleicos desnudos, ácidos nucleicos formulados con porciones que contienen lípidos, vectores no-alfavirus (que incluyen pero sin limitarse a vectores de la viruela, vectores adenovirales, vectores de herpes, vectores de virus de la estomatitis vesicular, vectores paramyxoviral, vectores de parvovirus, vectores papovavirus, vectores retrovirales), y otros vectores de alfavirus. Los vectores virales pueden ser partículas tipo-virus o ácidos nucleicos. Los vectores de alfavirus pueden ser partículas que contienen replicón, vectores que contienen replicón basado en ADN (a veces denominado como un sistema de "ELVIS", ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos núm. 5,814,482) o vectores de ARN desnudos.

65 Las composiciones de la presente invención se pueden emplear además para producir una respuesta inmune contra agentes infecciosos crónicos o latentes, que típicamente persisten porque fallan para inducir una respuesta inmune fuerte en el sujeto. Agentes infecciosos latentes o crónicos ilustrativos incluyen, pero sin limitarse a, hepatitis B, hepatitis C, virus de Epstein-Barr, virus del herpes, virus de la inmunodeficiencia humana, y virus del papiloma

humano. Los vectores de alfavirus que codifican péptidos y/o proteínas de estos agentes infecciosos se pueden administrar a una célula o un sujeto de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción.

5 Alternativamente, la proteína o péptido inmunogénico puede ser cualquier antígeno de célula tumoral o cáncer. Preferentemente, el antígeno de tumor o cáncer se expresa en la superficie de la célula del cáncer. Los antígenos de
 10 cáncer ilustrativos para cánceres específicos de mama son los antígenos HER2 y BRCA1. Otros antígenos de células tumorales y cáncer ilustrativos se describen en S.A. Rosenberg, (1999) Immunity 10:281) e incluyen, pero sin limitarse a, MART-1/MelanA, gp100, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, β -catenina, MUM-1, Caspasa-8, KIAA0205, HPVE&, SART-1, PRAME, antígenos p15 y p53,
 15 antígeno del tumor de Wilms, tirosinasa, antígeno carcinoembriogénico (CEA), antígeno específico de próstata (PSA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), antígeno de célula madre de próstata (PSCA), aspartil humano (asparaginil) β -hidroxilasa (HAAH), y EphA2 (una tirosina quinasa de célula epitelial, ver publicación de patente internacional documento WO núm. 01/12172).

15 El polipéptido o péptido inmunogénico de esta invención también puede ser un antígeno de célula tumoral o cáncer "universal" o "artificial" como se describe en la publicación de patente internacional documento WO 99/51263, incorporado en la presente como referencia en su totalidad para las enseñanzas de tales antígenos.

20 En diversas modalidades, el ácido nucleico heterólogo de esta invención puede codificar una secuencia de ácido nucleico antisentido. Un ácido nucleico "antisentido" es una molécula de ácido nucleico (es decir, ADN o ARN) que es complementaria (es decir, capaz de hibridar *in vivo* o bajo condiciones rigurosas *in vitro*) a la totalidad o una porción de un ácido nucleico (*por ejemplo*, un gen, un ADNc y/o ARNm) que codifica o está involucrado en la expresión del ácido nucleico que codifica un polipéptido a ser objetivo de la producción inhibida o reducida por la acción del ácido nucleico antisentido. Si se desea, los métodos convencionales se pueden usar para producir un
 25 ácido nucleico antisentido que contiene modificaciones deseables. Por ejemplo, un oligonucleótido de fosforotioato se puede usar como el ácido nucleico antisentido para inhibir *in vivo* la degradación por nucleasas del oligonucleótido antisentido. Cuando el ácido nucleico antisentido es complementario a una porción del ácido nucleico que codifica el polipéptido a ser objetivo, el ácido nucleico antisentido debe hibridar lo suficientemente cerca al extremo 5' del ácido nucleico que codifica el polipéptido tal que inhibe la traducción de un polipéptido funcional.
 30 Típicamente, esto significa que el ácido nucleico antisentido debe ser complementario a una secuencia que está dentro de la mitad o tercera parte 5' del ácido nucleico al que se hibrida.

35 Un ácido nucleico antisentido de esta invención puede codificar además un ARN catalítico (es decir, una ribozima) que inhibe la expresión de un ácido nucleico objetivo en una célula hidrolizando un ARNm que codifica el producto génico objetivo. Adicionalmente, el ARN cabeza de martillo se puede usar como un ácido nucleico antisentido para prevenir el corte y empalme del intrón. Un ácido nucleico antisentido de esta invención se puede producir y probar de acuerdo con los protocolos de rutina en la técnica para tecnología antisentido.

40 El término "alfavirus" como se usa en la presente descripción tiene su significado convencional en la técnica, e incluye el virus de la encefalitis equina oriental (EEE), virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), virus de Everglades, virus Mucambo, virus Pixuna, virus de la encefalitis occidental (WEE), virus Sindbis, arbovirus sudafricano núm. 86 (S.A.AR86), virus de Girdwood S.A., virus Ockelbo, virus de los bosques de Semliki, virus Middleburg, virus Chikungunya, virus O'Nyong-Nyong, virus del Río Ross, virus de los bosques de Barmah, virus Getah, virus Sagiyama, virus Bebaru, virus Mayaro, virus Una, virus Aura, virus Whataroa, virus Babanki, virus Kyzlagach, virus Highlands J, virus de Fort Morgan, virus Ndumu, virus Buggy Creek, y cualquier otro virus clasificado por el Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (ICTV) como un alfavirus.

45 En modalidades específicas de esta invención, los ácidos nucleicos y/o las proteínas codificadas por los ácidos nucleicos de la presente invención pueden comprender mutaciones atenuantes. Las frases "mutación atenuante" y "aminoácido atenuante," como se utiliza en la presente, incluye una secuencia de nucleótidos que contienen una mutación, o un aminoácido codificado por una secuencia de nucleótidos que contienen una mutación, que resulta en una probabilidad disminuida para causar la enfermedad en su huésped (es decir, reducción o "atenuación de la virulencia), de acuerdo con la terminología estándar en la técnica. Ver, por ejemplo, Davis y otros, MICROBIOLOGY 132 (3ra edición 1980). La frase "mutación de atenuación" excluye las mutaciones o combinaciones de mutaciones
 50 que pueden ser letales para el virus. Sin embargo, incluye de cualquier otra forma aquellas mutaciones letales que pueden incorporarse en conjunto con una mutación resucitante o de rescate que conduce a un fenotipo atenuado.

55 Mutaciones atenuantes apropiadas dependerán del alfavirus usado, y se conocerán por aquellos con experiencia en la materia. Las mutaciones atenuantes ilustrativas incluyen, pero sin limitarse a, las descritas en la patente de Estados Unidos núm. 5,505,947 de Johnston y otros, patente de Estados Unidos núm. 5,185,440 de Johnston y otros, patente de Estados Unidos núm. 5,643,576 de Davis y otros, patente de Estados Unidos núm. 5,792,462 de Johnston y otros, y la patente de Estados Unidos núm. 5,639,650 de Johnston y otros, cuyas descripciones se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

60 En varias modalidades de esta invención, una o más de las proteínas estructurales de alfavirus de las partículas de alfavirus de esta invención puede comprender una o más mutaciones atenuantes, por ejemplo, como se define en

las patentes de Estados Unidos núms. 5,792,462 y 6,156,558. Mutaciones atenuantes específicas para la glicoproteína de VEE E1 pueden incluir una mutación atenuante en cualquiera de las posiciones de los aminoácidos 81, 272 y/o 253 de E1. Partículas de alfavirus fabricadas a partir del mutante VEE-3042 contienen una sustitución de isoleucina en E1-81, y las partículas virales fabricadas a partir del mutante VEE-3040 contienen una mutación atenuante en E1-253. Mutaciones atenuantes específicas para la glicoproteína de VEE E2 pueden incluir una mutación atenuante en cualquiera de las posiciones de los aminoácidos 76, 120, o 209 de E2. Partículas de alfavirus fabricadas a partir del mutante VEE-3014 contienen mutaciones atenuantes tanto en E1-272 como en E2-209 (ver patente de Estados Unidos núm. 5,792,492). Una mutación atenuante específica para la glicoproteína VEE E3 incluye una mutación atenuante que consiste en una delección de los aminoácidos 56-59 de E3. Partículas de virus fabricadas a partir del mutante VEE-3526 contienen esta delección en E3 (aa56-59), así como una segunda mutación atenuante en E1-253. Mutaciones atenuantes específicas para la glicoproteína S.A.AR86 E2 incluyen una mutación atenuante en cualquiera de las posiciones de los aminoácidos 304, 314, 372, o 376 de E2. Alternativamente, la mutación atenuante puede ser una sustitución, delección y/o inserción de un aminoácido en la glicoproteína E2, por ejemplo, en cualquier una o más de las siguientes posiciones de aminoácidos en cualquier combinación: 158, 159, 160, 161 y 162 (ver Polo y otros, publicación PCT documento WO núm. 00/61772).

Otra mutación atenuante de esta invención puede ser una mutación atenuante en el nucleótido 3 del ARN genómico de VEE, *es decir*, el tercer nucleótido a continuación del cap metilado 5' (*ver, por ejemplo*, patente de Estados Unidos núm. 5,643,576, que describe una mutación de G→C en el nucleótido 3). La mutación puede ser una mutación G→A, U o C, pero puede ser también una G→A en algunas modalidades.

Quando las proteínas estructurales y/o no estructurales de alfavirus son a partir de S.A.AR86, las mutaciones atenuantes ilustrativas en las proteínas estructurales y no estructurales incluyen, pero sin limitarse a, codones en la posición del aminoácido 538 de nsp1 que especifican un aminoácido atenuante, preferentemente isoleucina como aminoácido 538 de nsp1; codones en la posición del aminoácido 304 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferentemente treonina como aminoácido 304 de E2; codones en la posición del aminoácido 314 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferentemente lisina como aminoácido 314 de E2; codones en el aminoácido 372 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferentemente leucina, en el residuo de aminoácido 372 de E2; codones en la posición del aminoácido 376 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferentemente alanina como aminoácido 376 de E2; en combinación, los codones en los residuos de aminoácidos 304, 314, 372 y 376 de E2 que especifican aminoácidos atenuantes, como se describió anteriormente; codones en la posición del aminoácido 96 de nsp2 que especifican un aminoácido atenuante, preferentemente glicina como aminoácido 96 de nsp2; y codones en la posición del aminoácido 372 de nsp2 que especifican un aminoácido atenuante, preferentemente valina como aminoácido 372 de nsp2; en combinación, codones en los residuos de aminoácidos 96 y 372 de nsp2 que codifican aminoácidos atenuantes en los residuos de aminoácidos 96 y 372 de nsp2, como se describió anteriormente; codones en residuo de aminoácido 529 de nsp2 que especifican un aminoácido atenuante, preferentemente leucina, en el residuo aminoácido 529 de nsp2; codones del residuo de aminoácido 571 de nsp2 que especifican un aminoácido atenuante, preferentemente asparagina, en el residuo aminoácido 571 de nsp2; codones del residuo de aminoácido 682 de nsp2 que especifican un aminoácido atenuante, preferentemente arginina, en el residuo aminoácido 682 de nsp2; codones del residuo de aminoácido 804 de nsp2 que especifican un aminoácido atenuante, preferentemente arginina, en el residuo aminoácido 804 de nsp2; codones del residuo de aminoácido 22 de nsp3 que especifican un aminoácido atenuante, preferentemente arginina, en el residuo aminoácido 22 de nsp3, y en combinación, codones de los residuos de aminoácidos 529, 571, 682 y 804 de nsp2 y en el residuo aminoácido 22 de nsp3 que especifican aminoácidos atenuantes, como se describió anteriormente.

Otras mutaciones atenuantes ilustrativas incluyen aquellas descritas en la solicitud del PTC núm. PCT/US01/27644. Por ejemplo, la mutación atenuante puede ser una mutación atenuante en la posición del aminoácido 537 de la proteína nsp3 S.A.AR86, con mayor preferencia una mutación de sustitución en esta posición, aún con mayor preferencia una mutación terminadora que da como resultado la sustitución de un codón de terminación. Codones de terminación de la traducción (*es decir*, de parada) son conocidos en la técnica e incluyen, los codones de terminación "ópalo" (UGA), "ámbar" (UAG) y "ocre" (UAA). En modalidades de la invención, la mutación atenuante puede resultar en una sustitución Cys →ópalo en la posición del aminoácido 537 de nsp3 S.A.AR86.

Más aun las mutaciones atenuantes ilustrativas pueden incluir una mutación atenuante de inserción a continuación del aminoácido 385 de la proteína nsp3 S.A.AR86. La inserción puede comprender una inserción de al menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 o 20 aminoácidos. En algunas modalidades de la invención, la secuencia de aminoácidos insertada es rica en residuos de serina y treonina (*por ejemplo*, comprende al menos 2, 4, 6, u 8 de tales sitios) que sirven como un sustrato para la fosforilación por las serina/treonina quinasas.

En algunas modalidades, la mutación atenuante puede comprender la inserción de la secuencia de aminoácidos Ile-Thr-Ser-Met-Asp-Ser-Trp-Ser-Ser-Gly-Pro-Ser-Ser-Leu-Glu-Ile-Val-Asp (**sec. con núm. de ident.:1**) después del aminoácido 385 de nsp3 (*es decir*, el primer aminoácido se designa como el aminoácido 386 en nsp3). En otras modalidades de la invención, la mutación de inserción puede comprender la inserción de un fragmento de **sec. con núm. de ident.:1** que resulta en un fenotipo atenuado. El fragmento puede comprender al menos 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16 o 17 aminoácidos contiguos de **sec. con núm. de ident.:1**.

5 Aquellos con experiencia en la materia apreciarán que otras secuencias atenuantes de inserción que comprenden un fragmento de la secuencia expuesta anteriormente, o que incorporan sustituciones conservadoras de aminoácidos en la secuencia expuesta anteriormente, se pueden identificar de manera rutinaria por métodos de rutina (como se describió anteriormente). Sin desear estar limitado por ninguna teoría de la invención, parece que la secuencia de inserción de **sec. con núm. de ident.:1** es altamente fosforilada en residuos de serina, que confiere un fenotipo atenuado. Así, otras secuencias atenuantes de inserción que sirven como sustratos para la fosforilación de serina (o treonina) se pueden identificar por técnicas convencionales conocidas en la técnica. Alternativamente, o adicionalmente, hay una sustitución de Tyr→Ser en el aminoácido 385 de la proteína nsp3 de S.A.AR86 (*es decir*, 10 justo antes de la secuencia de inserción anterior). Esta secuencia se conserva en los virus Sindbis grupo-no virulento, pero se delecionan de S.A.AR86.

15 En otras modalidades, el alfavirus de esta invención puede ser cualquier cepa del virus Sindbis (por ejemplo, TR339), VEE (que tiene una mutación en el nucleótido 3 del ARN genómico a continuación del cap metilado), virus S.A.AR86, virus de Girdwood S.A., virus de Ockelbo, y/o los virus quiméricos de estos. Las secuencias genómicas completas, así como las secuencias de las varias proteínas estructurales y no estructurales, se conocen en la técnica para numerosos alfavirus e incluyen: la secuencia genómica del virus Sindbis (número de acceso del GenBank. J02363, número de acceso de NCBI NC_001547), secuencia genómica de S.A.AR86 (número de acceso del GenBank. U38305), secuencia genómica de VEE (número de acceso del GenBank. L04653, número de acceso de NCBI NC_001449), secuencia genómica de Girdwood S.A (número de acceso del GenBank. U38304), secuencia genómica del virus de los bosques de Semliki (número de acceso del GenBank X04129, número de acceso de NCBI NC_003215), y la secuencia genómica de TR339 (Klimstra y otros (1988) J. Virol. 72:7357; McKnight y otros (1996) J. Virol. 70:1981).

25 En modalidades particulares de la presente invención, la proteína estructural de alfavirus de esta invención puede ser una proteína estructural del virus Sindbis, una proteína estructural de SFV, una proteína estructural de VEE, una proteína estructural del virus del Río Ross, una proteína estructural de S.A. AR86, una proteína estructural de EEE y/o una proteína estructural de WEE. Estas se pueden presentar en cualquier combinación entre sí y puede estar presente en combinación con cualquiera de las proteínas no estructurales de alfavirus y/o otras secuencias 30 alfavirales, tales como la secuencia de reconocimiento de la replicación del 5' alfavirus, el promotor subgenómico de alfavirus y la secuencia de reconocimiento de la replicación del 3' alfavirus, a partir de cualquiera de estos y/u otros alfaviruses, para producir partículas recombinantes quiméricas de alfavirus y/o ácidos nucleicos recombinantes quiméricos de esta invención.

35 En modalidades adicionales, el elemento IRES de esta invención dirige la traducción del producto génico codificado por el ácido nucleico heterólogo del ácido nucleico recombinante de esta invención, de manera que al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la traducción del producto génico codificado por el ácido nucleico heterólogo se controla por la actividad del elemento IRES. El porcentaje de traducción del producto génico codificado por el ácido nucleico 40 heterólogo en los ácidos nucleicos replicones recombinantes de esta invención como controlado por el IRES se puede determinar de acuerdo con los ensayos bien conocidos en la técnica y como se describe en la sección de Ejemplos que se proporciona en la presente descripción.

45 Además, en modalidades de esta invención en donde el elemento IRES de esta invención dirige la traducción de un proteína de alfavirus estructural presente en un constructo cooperador de esta invención, el elemento IRES de esta invención puede dirigir la traducción de las proteínas estructurales, de manera que al menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la traducción de la proteína estructural se controla por la actividad del elemento IRES. El porcentaje de traducción de la(s) proteína(s) estructural(es) como se controla por el elemento IRES de esta invención se puede 50 determinar de acuerdo con los ensayos bien conocidos en la técnica y como se describe en la sección de Ejemplos que se proporciona en la presente descripción.

El ácido nucleico de esta invención puede ser ARN o ADN.

55 En otra modalidad, una serie de ácidos nucleicos cooperadores ("constructos cooperadores" o "moléculas cooperadoras"), es decir, se proporcionan moléculas de ADN o ARN recombinantes que expresan una o más proteínas estructurales de alfavirus. En un conjunto de modalidades de ARN, el constructo cooperador comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica (i) una secuencia de reconocimiento de la replicación del 5' alfavirus, (ii) un promotor transcripcional, (iii) una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una, pero no 60 todas, las proteínas estructurales de alfavirus, y (iv) una secuencia de reconocimiento de la replicación del 3' alfavirus. En algunas modalidades, las glicoproteínas E1 y E2 se codifican por un constructo cooperador, y la proteína de la cápsida se codifica por otro constructo cooperador distinto. En otra modalidad, la glicoproteína E1, glicoproteína E2, y proteína de la cápsida se codifican cada una por constructos cooperadores distintos. En otras modalidades, la proteína de la cápsida y una de las glicoproteínas se codifican por un constructo cooperador, y la otra glicoproteína se codifica por un segundo constructo cooperador distinto. En otras modalidades, la proteína de la 65 cápsida y la glicoproteína E1 se codifican por un constructo cooperador y la proteína de la cápsida y la glicoproteína

E2 se codifican por un constructo cooperador distinto. En algunas modalidades, los constructos cooperadores de esta invención no incluyen una señal de empaquetamiento de alfavirus.

5 Alternativamente, los ácidos nucleicos cooperadores descritos anteriormente se construyen como moléculas de ADN, que se pueden integrar de manera estable en el genoma de una célula cooperadora o expresada a partir de un episoma (*por ejemplo*, un episoma derivado de EBV). La molécula de ADN puede expresarse además de manera transitoria en una célula. La molécula de ADN puede ser cualquier vector conocido en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, un vector de ADN no-integrador, tal como un plásmido, o un vector viral. La molécula de ADN puede codificar una o todas las proteínas estructurales de alfavirus, en cualquier combinación, como se describe en la presente descripción.

10 Los constructos cooperadores se introducen en las "células cooperadoras," que se usan para producir las partículas de alfavirus de esta invención. Como se indicó anteriormente, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas estructurales de alfavirus se pueden presentar en la célula cooperadora de manera transitoria o por integración estable dentro del genoma de la célula cooperadora. El ácido nucleico que codifica las proteínas estructurales de alfavirus que se usan para producir las partículas de alfavirus de esta invención puede estar bajo el control de promotores constitutivos y/o inducibles. Como se indicó anteriormente además, las secuencias que codifican la proteína estructural de alfavirus se pueden proporcionar en un ácido nucleico replicón recombinante y/o un constructo cooperador que comprende un elemento IRES y la traducción de estas secuencias codificantes se pueden controlar por la actividad de un elemento de IRES. En tales modalidades, el elemento IRES puede ser activo en el tipo de célula cooperadora específica y no es activo, o mínimamente activo en otros tipos de células. En modalidades particulares, las células cooperadores comprenden las secuencias de ácido nucleicos que codifican las proteínas estructurales de alfavirus en una combinación y/o cantidad suficiente para producir una partícula de alfavirus de esta invención cuando un ácido nucleico replicón recombinante se introduce en la célula bajo condiciones en las que se producen las proteínas estructurales de alfavirus y el ácido nucleico replicón recombinante se empaqueta en las partículas de alfavirus de esta invención.

25 En todas las modalidades de esta invención, se contempla que al menos una de las proteínas estructurales y/o no estructurales de alfavirus codificadas por el ácido nucleico replicón recombinante y/o moléculas cooperadoras, y/o las regiones no traducidas del replicón recombinante y/o ácido nucleico cooperador, pueden contener una o más mutaciones atenuantes en cualquier combinación, tal como se describe en la presente descripción y que son bien conocidos en la literatura.

30 En particular en los constructos de esta invención, se emplea un promotor para dirigir la transcripción de ARN a partir del ADN, es decir, una ARN polimerasa dependiente de ADN. En las modalidades del ARN cooperador y replicón de esta invención, el promotor se utiliza para sintetizar ARN en una reacción de transcripción *in vitro*, y promotores específicos adecuados para este uso incluyen, pero sin limitarse a, los promotores de ARN polimerasa SP6, T7, y T3. En las modalidades de ADN cooperador, el promotor funciona dentro de una célula para dirigir la transcripción del ARN. Promotores potenciales para la transcripción *in vivo* del constructo incluyen, pero sin limitarse a, promotores eucarióticos tales como promotores de ARN polimerasa II, promotores de ARN polimerasa III, o promotores virales tales como MMTV y MoSV LTR, región temprana de SV40, RSV o CMV. Muchos otros promotores de mamífero y virales adecuados para la presente invención están disponibles y son conocidos en la técnica. Alternativamente, los promotores de la ARN polimerasa dependiente de ADN a partir de bacteria o bacteriófago, por ejemplo, SP6, T7, y T3, se pueden emplear para el uso *in vivo*, con la ARN polimerasa coincidente que se proporciona a la célula, ya sea a través de un plásmido distinto, vector de ARN, o vector viral. En una modalidad específica, la ARN polimerasa coincidente puede transformarse de forma estable en una línea de célula cooperadora bajo el control de un promotor inducible. Los constructos que funcionan dentro de una célula pueden funcionar como plásmidos autónomos transfectados en la célula y/o pueden transformarse de forma estable en el genoma. En una línea celular transformada de forma estable, el promotor puede ser un promotor inducible, tal que la célula solo producirá la ARN polimerasa codificada por el constructo transformado de manera estable cuando la célula se expone al estímulo apropiado (inductor). Los constructos cooperadores se introducen en la célula transformada de forma estable concomitantemente con, antes de, y/o después de la exposición a, el inductor, efectuando de ese modo la expresión de las proteínas estructurales de alfavirus. Alternativamente, los constructos diseñados para funcionar dentro de una célula se pueden introducir en la célula a través de un vector viral, tales como, por ejemplo, adenovirus, poxvirus, virus adeno-asociado, SV40, retrovirus, nodavirus, picornavirus, virus de la estomatitis vesicular, y baculovirus con promotores pol II de mamíferos.

50 En algunas modalidades de la invención que se proporciona en la presente descripción, el ácido nucleico replicón recombinante y/o ácido nucleico cooperador de esta invención pueden comprender un ácido nucleico espaciador, que puede ubicarse corriente arriba de un elemento IRES en un ácido nucleico replicón recombinante y/o ácido nucleico cooperador de esta invención. El ácido nucleico espaciador puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en cualquier secuencia específica o aleatoria de ácido nucleico no-codificante, que es de una longitud suficiente para evitar al menos algunos, y en algunas modalidades, la traducción total del cap 5' de un ARN mensajero, tal que la traducción se dirige después por el IRES, en parte o en su totalidad. Alternativamente, el ácido nucleico espaciador puede ser de una longitud y estructura de secuencia que imparta estructura secundaria

ES 2 453 344 T3

suficiente al ácido nucleico para evitar al menos alguna y posiblemente toda la actividad de traducción del cap 5' de un ARN mensajero.

5 Como ejemplo, un plásmido disponible en el comercio, pCADN 3.1(-), se digirió con una enzima de restricción, AluI, que corta frecuentemente dentro de este plásmido, generando así muchos fragmentos aleatorios y de diferentes tamaños (ver el Ejemplo 3 para los detalles). El plásmido pCADN tiene 5427 nucleótidos de longitud, y es un vector de expresión eucariótico, que comprende varios promotores (CMV, T7, SV40) para la expresión de un ácido nucleico insertado, así como señales de poliadenilación y genes de resistencia a antibióticos. La enzima AluI corta a través de estos elementos, proporcionando un intervalo de fragmentos aleatorios. Los ejemplos de diversos espaciadores diferentes y sus secuencias que se generaron a partir de este ejemplo y que no codifican cualquiera de los elementos funcionales del plásmido, se proporcionan a continuación:

357 nucleótido espaciador:

10 CTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGC
AATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAG
CTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACC
AAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGTCT
TGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGC
TGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGT
15 TACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACA
GCCAG

342 nucleótido espaciador:

20 CTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAA
AAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCG
TTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGG
GTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTC
TGATGCCCGCGTGTTCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGT
CAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGC
GGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAG

257 nucleótido espaciador:

25 CTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAA
AGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTC
CACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTAT
CAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGG
GTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGAT
TTAGAG

383 nucleótido espaciador:

CTGCGCAAGGAACGCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCG
TCCTGCAGTTCATTCAGGGCACCGGACAGGTCGGTCTTGACAAAAGAAC
CGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCG
ATTGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGCC
GGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCATCATGCGAAACGATCCTCAT
CCTGTCTCTTGATCAGATCCGAAAATGGATATAACAAGCTCACTCATTAGGC
ACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGT
GAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG

579 nucleótido espaciador:

CTGCAATAACAAGTTGGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCCG
 CGCTGGAGGATCATCCAGCCGGCGTCCCGGAAAACGATTCCGAAGCCCAA
 CCTTTCATAGAAGGGCGGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGG
 GCGTCGCTTGGTCGGTCATTTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACT
 CGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGAT
 ACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTGAGCCCATTCGCCGCCAAGCTTGTATA
 TCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATT
 GAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCT
 ATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCG
 TGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACC
 TGTCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGG
 CTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAG

5

749 nucleótido espaciador:

CTGCAATAACAAGTTGGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCCG
 CGCTGGAGGATCATCCAGCCGGCGTCCCGGAAAACGATTCCGAAGCCCAA
 CCTTTCATAGAAGGGCGGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGG
 GCGTCGCTTGGTCGGTCATTTTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACT
 CGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGAT
 ACCGTAAAGCACGAGGAAGCGGTGAGCCCATTCGCCGCCAAGCTCTTCAG
 CAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGTCCGCCACACCC
 AGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGAT
 ATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTCACGACGAGATCCTCGCGTCGG
 GCATGCGCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCCTGA
 TGCTCTTCGTCCAGATCATCCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTA
 CGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTGAATGGGCAGGTAGCC
 GGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGATTGCATCAGCCATGATGGATACTTT
 CTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCGGCCACTTCGC
 CCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAG

10 Adicionalmente del uso de fragmentos aleatorios de ácido nucleico generados a partir de un plásmido no relacionado
 (como en los fragmentos Alul descritos anteriormente), es posible además usar los fragmentos de genes celulares o
 virales, por ejemplo, a partir de las regiones no codificantes 5' de los genes, como espaciadores. Un enfoque
 consiste en usar las secuencias no codificantes que comprendan un IRES existente (ver Ejemplo 4B.4.); otro
 enfoque es usar la región 5' no codificante de un gen de alfavirus, por ejemplo, el gen de la cápsida (ver Ejemplo
 15 4A.2.)

Así, se contempla que el ácido nucleico espaciador de esta invención puede ser en un mínimo, al menos 25 ácidos
 nucleicos de longitud y puede ser tan largo como admisible en un ácido nucleico replicón recombinante dado. Por
 ejemplo, el ácido nucleico espaciador de esta invención puede ser, en algunas modalidades, aproximadamente 25,
 20 30, 35, 40, 45, 50,55, 60, 65, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 160, 170, 175,
 180, 190, 200, 210, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700,
 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000,7500, 8000, 8500, 9000,
 9500, o 10,000 nucleótidos de longitud. Por "aproximadamente" se entiende que el ácido nucleico espaciador puede
 variar hasta 10%, 15%, 20% y/o 25% en longitud.

25 El ácido nucleico espaciador de esta invención puede ser además una secuencia de nucleótidos ubicada 3' en una
 secuencia 5' para iniciar la transcripción de un ARN mensajero, y 5' en un elemento IRES funcional, en donde el
 nivel de traducción dirigida desde dicho elemento de IRES es al menos aproximadamente cinco veces mayor que el
 nivel obtenido a partir de un elemento IRES no funcional En modalidades preferidas, el nivel de la traducción es al
 30 menos aproximadamente 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 150 veces, 180 veces, 200 veces, 300 veces,
 400 veces o 500 veces mayor. En otras modalidades, al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%,
 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la traducción del producto génico codificado por el ácido
 nucleico heterólogo y/o las proteínas estructurales codificadas por un constructo cooperador que contiene IRES se
 controla por la actividad del elemento IRES.

35 La presente invención proporciona además una partícula de alfavirus que comprende un ácido nucleico replicón
 recombinante de esta invención. Se proporciona además una población de partículas de alfavirus infecciosas,

defectuosas, en donde cada partícula contiene un ARN replicón de alfavirus que comprende el ácido nucleico de replicón recombinante de esta invención. En algunas modalidades, la población de esta invención no contiene virus de replicación competente detectable, tal como se mide mediante el paso en el cultivo de células y/u otros ensayos bien conocidos para la detección de virus de replicación competente.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico, vector, partícula y/o población de esta invención en un portador farmacéuticamente aceptable. Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de cualquier otra forma indeseable, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con el péptido, polipéptido, ácido nucleico, vector o célula seleccionada sin causar efectos biológicos nocivos sustanciales o interactuar de una manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición en la que está incluido.

Además, cualquiera de las composiciones de esta invención puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable y un adyuvante adecuado. Como se utiliza en la presente, "adyuvante adecuado" describe un adyuvante capaz de ser combinado con el péptido o polipéptido de esta invención para mejorar más aun una respuesta inmune sin efecto perjudicial en el sujeto o la célula del sujeto. Un adyuvante adecuado puede ser, pero sin limitarse a, MONTANIDE ISA51 (Seppic, Inc., Fairfield, NJ), formulación adyuvante SYNTEX 1 (SAF-1), compuesta de 5 por ciento (p/v) de escualeno (DASF, Parsippany, N.J.), 2.5 por ciento de Pluronic, polímero L121 (Aldrich Chemical, Milwaukee), y 0.2 por ciento de polisorbato (Tween 80, Sigma) en solución salina tamponada con fosfato. Otros adyuvantes adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen QS-21, adyuvante de Freund (completo e incompleto), sales de aluminio (alum), fosfato aluminico, hidróxido aluminico, N-acetilo-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetilo-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, referido como no-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, referido como MTP-PE) y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacteria, monofosforil lípido A, trealosa dimicolato y esqueleto de la pared celular (MPL+TDM+CWS) en 2% de emulsión de escualeno/Tween 80. Los adyuvantes se pueden combinar, ya sea con las composiciones de esta invención o con otras composiciones de vacuna que se pueden usar en combinación con las composiciones de esta invención. Los ejemplos de adyuvantes pueden incluir además, pero sin limitarse a, formulaciones de emulsión de aceite-en-agua, agentes inmunoestimulantes, tales como componentes bacterianos de la pared celular o moléculas sintéticas, u oligonucleótidos (por ejemplo CpGs) y los polímeros de ácidos nucleicos (tanto ARN y ADN bicatenario y de cadena sencilla), que puede incorporar porciones alternativas de cadena principal, por ejemplo, polímeros de polivinilo.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir además otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, portadores, diluyentes, citocinas inmunoestimuladoras, etc. Los métodos actuales para preparar tales formas de dosificación son conocidos, o resultarán evidentes, para los expertos en esta técnica. Las dosificaciones preferidas para partículas de replicones de alfavirus, como se contempla por esta invención, pueden estar en el intervalo de 10^3 a 10^{10} partículas por dosis. Las dosis preferidas para humanos son 10^6 , 10^7 o 10^8 . Un régimen de dosificación puede ser una o más dosis cada hora, diaria, semanal, mensual, anual, etc. que se consideren necesarias para alcanzar el efecto profiláctico y/o terapéutico deseado a alcanzar por la administración de una composición de esta invención a un sujeto. La eficacia de una dosis particular se puede determinar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

La presente invención proporciona además un método para fabricar partículas de alfavirus defectuosas infecciosas, que comprende: a) introducir en una célula lo siguiente: (i) un ácido nucleico replicón recombinante de esta invención, y (ii) uno o más ácidos nucleicos cooperadores que codifican proteínas estructurales de alfavirus, en donde uno o más ácidos nucleicos cooperadores producen todas las proteínas estructurales de alfavirus, y b) producir dichas partículas de alfavirus en la célula. En algunas modalidades, el ácido nucleico replicón recombinante puede comprender al menos un ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína estructural de alfavirus.

En otras modalidades de los métodos de esta invención, el ácido nucleico cooperador puede ser un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de reconocimiento de replicación del 5' alfavirus, un promotor subgenómico de alfavirus, un ácido nucleico que codifica una proteína estructural del alfavirus y una secuencia de reconocimiento de replicación del 3' alfavirus.

En modalidades adicionales, el ácido nucleico cooperador puede ser un ácido nucleico recombinante (que puede ser ADN) que comprende un promotor (por ejemplo, un promotor de CMV) y secuencias de nucleótidos que codifican una o más, incluyendo todas, las proteínas estructurales de alfavirus.

El ácido nucleico cooperador puede comprender secuencias de ácidos nucleicos que codifican una cualquiera o más de las proteínas estructurales de alfavirus (C, E1, E2) en cualquier orden y/o en cualquier combinación. Así, una célula cooperadora puede comprender muchos ácidos nucleicos ayudantes según sea necesario para proporcionar todas las proteínas estructurales de alfavirus necesarias para producir partículas de alfavirus. Una célula cooperadora puede comprender además ácido(s) nucleico(s) cooperador(es) integrado(s) de forma estable en el genoma de una célula cooperadora (por ejemplo, empaque). En tales células cooperadoras, las proteínas estructurales de alfavirus se pueden producir bajo el control de un promotor que puede ser un promotor inducible.

En algunas modalidades, el ácido nucleico cooperador empleado en los métodos de esta invención puede ser un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de reconocimiento de replicación del 5' alfavirus, un elemento IRES, un ácido nucleico que codifica una proteína estructural del alfavirus y una secuencia de reconocimiento de replicación del 3' alfavirus.

En modalidades adicionales, el ácido nucleico cooperador puede ser un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de reconocimiento de replicación del 5' alfavirus un promotor subgenómico de alfavirus, un elemento IRES, un ácido nucleico que codifica una o más proteínas estructurales del alfavirus y una secuencia de reconocimiento de replicación del 3' alfavirus.

Además se proporciona en la presente descripción un método para fabricar, partículas de alfavirus defectuosas infecciosas, que comprende: a) introducir en una célula lo siguiente: i) un ARN replicón de alfavirus que comprende una secuencia de reconocimiento de replicación del 5' alfavirus, secuencia(s) de ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) proteínas no estructurales de alfavirus, un promotor subgenómico de alfavirus, una secuencia de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de reconocimiento de replicación del 3' alfavirus, y ii) uno o más ácidos nucleicos cooperadores que codifican proteínas estructurales de alfavirus que comprenden una secuencia de reconocimiento de replicación del 5' alfavirus, un promotor subgenómico de alfavirus, un elemento IRES, un ácido nucleico que codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus y una secuencia de reconocimiento de replicación del 3' alfavirus, por lo cual todas las proteínas estructurales de alfavirus se producen en la célula; y b) producir dichas partículas de alfavirus en la célula.

Un método se proporciona además en la presente descripción para preparar partículas de alfavirus defectuosas infecciosas, que comprende: a) introducir en una célula lo siguiente: i) un ARN replicón de alfavirus que comprende una secuencia de reconocimiento de replicación del 5' alfavirus, secuencia(s) de ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) proteínas no estructurales de alfavirus, al menos un promotor subgenómico del alfavirus, al menos un elemento IRES, al menos una secuencia de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de reconocimiento de replicación del 3' alfavirus, y ii) uno o más ácidos nucleicos cooperadores que codifican proteínas estructurales de alfavirus que comprende: (a) una secuencia de reconocimiento de replicación del 5' alfavirus, (b) un casete promotor subgenómico de alfavirus-IRES-NOI heterólogo, que está en la orientación 5' a 3', en donde el NOI codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus; y (c) una secuencia de reconocimiento de replicación del 3' alfavirus, por lo que todas las proteínas estructurales de alfavirus se producen en la célula; y b) producir dichas partículas de alfavirus en la célula.

Los métodos para preparar partículas de alfavirus de esta invención pueden comprender además la etapa de recoger dichas partículas de alfavirus de la célula.

La presente invención proporciona además un ácido nucleico recombinante que comprende: (a) una secuencia de reconocimiento de replicación del 5' alfavirus, (b) un casete promotor subgenómico alfavirus-IRES- NOI heterólogo, que está en la orientación 5' a 3', en donde el NOI codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus en cualquier combinación y/o orden, y (c) una secuencia de reconocimiento de replicación del 3' alfavirus. En algunas modalidades, este ácido nucleico cooperador recombinante puede comprender una secuencia de nucleótidos espaciadora que puede estar corriente arriba de un elemento IRES. Se proporciona además un vector y/o una célula que comprende este ácido nucleico recombinante.

Además se proporciona en la presente descripción el ácido nucleico recombinante que comprende:

- (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de reconocimiento de la replicación del 5' alfavirus;
- (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del alfavirus no estructural;
- (c) un primer casete promotor subgenómico de alfavirus-IRES-NOI heterólogo, que está en la orientación 5' a 3';
- (d) un segundo casete promotor subgenómico de alfavirus- IRES-NOI heterólogo, que está en la orientación 5' a 3'; y
- (e) un ácido nucleico que codifica una secuencia de reconocimiento de la replicación del 3' alfavirus.

En algunas modalidades, el primer y segundo promotor subgenómico de alfavirus puede ser el mismo o diferentes, el primer y segundo elemento IRES puede ser el mismo o diferente y/o el primer y segundo ácido nucleico heterólogo puede ser el mismo o diferente. Este ácido nucleico recombinante puede comprender una señal de empaquetamiento de alfavirus y/o una secuencia de nucleótidos espaciadora que puede estar corriente arriba de un elemento IRES. Este ácido nucleico recombinante puede comprender además una o más secuencias del segundo ácido nucleico que codifica proteínas no estructurales de alfavirus en cualquier orden y/o combinación, tal que todas las cuatro secuencias que codifican proteínas no estructurales de alfavirus estén presentes en el ácido nucleico recombinante. Este ácido nucleico recombinante puede estar presente en una partícula de alfavirus de esta invención y tales partículas pueden estar presentes como una población de esta invención y/o en una composición farmacéutica de esta invención.

Se proporciona además un ácido nucleico replicón recombinante como se describió anteriormente, que comprende además un tercer o además promotor subgenómico de alfavirus adicional, un tercer o además elemento IRES adicional y/o un tercer o además ácido nucleico heterólogo adicional. Este ácido nucleico recombinante puede estar presente en una partícula de alfavirus de esta invención y tales partículas pueden estar presentes como una población de esta invención y/o en una composición farmacéutica de esta invención. Las partículas de alfavirus que comprenden esta modalidad de ácido nucleico recombinante se pueden producir de acuerdo con cualquiera de los métodos de esta invención y se puede usar en cualquiera de los métodos para inducir una respuesta inmune y/o el suministro de un NOI a una célula.

10 Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción de vectores de clonación de transferencia

15 A. Vectores que contienen IRES de EMCV

Un vector de transferencia (pCDNA3.3) se preparó en el que la secuencia IRES de encefalomiocarditis (EMCV) y cualquier NOI se pueden introducir. El plásmido pCDNA3.1(+) (Nitrógeno) se digirió con la enzima de restricción Bathe y se trató con T4 ADN polimerasa para eliminar el único sitio de restricción Bathe, resultando en la generación de pCDNA3.2. El ADN pCDNA3.2 se digirió además con la enzima de restricción Bay y trató además con T4 ADN polimerasa para eliminar el único sitio de restricción Bay, resultando en la generación de pCDNA3.3.

Un vector de clonación intermedio que contiene el sitio de clonación múltiple (MCS) de un vector replicón de VEE se preparó ligando un fragmento de MCS Apal/NotI de ~ 250 pb en ADN pBluescript KS+ (Stratagene) linearizado con Apal/NotI, generando pKS-rep2. La IRES de EMCV se digirió a partir de pD1+2+3 (Kaminski y otros, 1995) con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI y ligó en el ADN pKS-rep2 linearizado con EcoRI y BamHI, generando pKS-rep2/EMCV. Las secuencias de IRES de EMCV y MCS del vector pKS-rep2/EMCV se amplificaron por PCR usando cebadores EMCVF(Ascl) 2 y EMCVR (Ascl).1 (Tabla 1). El producto PCR de EMCV se digirió con la enzima de restricción Ascl y se ligó en el vector ADN replicón (pERK) de VEE linearizado con Ascl, generando pERK/EMCV. Para completar el vector de clonación de transferencia, el ADN pERK/EMCV se digirió con las enzimas de restricción EcoRV y NotI y el fragmento EcoRV/ NotI de 862 pb se ligó en el ADN pCDNA3.3 linearizado con EcoRV y NotI, generando pCDNA3.3/EMCV. La secuencia de IRES de EMCV y los sitios de clonación múltiples asociados se confirmaron en el vector pCDNA3.3/EMCV antes de preparar constructos adicionales con este.

Tabla 1

Nombre del Cebador	5'	Secuencia del cebador	3'
EMCVF(Ascl).2		TGGCGCGCCGCTCGGAATCCCCCTCTCCC	
EMCVR(Ascl).1		AGGCGGCCTTCTATGTAAGCAGCTTGCC	
F'-CAT(BamHI)		GCTGGATCCATGGAGAAAAAATCACTGGA	
R'-CAT(XbaI)		CGATCTAGATTACGCCCGCCCTGCCACTCA	
Anti-En(EcoRI)		CGGAATTCATTATCATCGTGTTTTTC	
Anti-EN(BamHI)		CGGGATCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGC	
Anti-En(Ascl)		AGGCGGCCATTATCATCGTGTTTTTC	
dAvr En(Ascl) R		AGGCGGCCCTAGGGGTCTTCCCCTCTC	
3.'UTR4Xbiotin		GCGGCATGCCAATCGCCGCGAGTTCTATGTAAGCAGCTTGCC	
GAG-F		CGGGATCCATGGCTGCGAGAGCGTCA	
GAG-R		CGGGATCCTTATTGAGACAAGGGGTCCG	

35

B. Vectores que contienen IRES de XIAP

El gen de la región no codificadora 5' (NCR) del inhibidor de la apoptosis ligado a X (XIAP) que contiene el elemento putativo IRES (ver Holcik y otros (1999) Nature Cell Biol 1: 190-192; Holcik y Korneluk (2000) Mol Cell Biol 20:4648-57y Holcik y otros. (2003) Mol Cell Biol 23:280-288 para la secuencia y el tamaño del elemento) se amplificó por PCR a partir de ADNc de hígado fetal humano Marathon ready (Clontech, Palo Alto, CA) usando un cebador adaptador suministrado con el ADNc y un cebador reverso de XIAP (XIAP-R) seguido por una PCR anidada usando cebadores específicos IRES de XIAP. Los cebadores se listan en la Tabla 2. Los productos de PCR resultantes de aproximadamente 1007 y 241 pb se clonaron TA usando un estuche disponible en el comercio (Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA). Estos constructos poseen ya sea 844 nucleótidos o 78 nucleótidos, respectivamente, de la región no codificante del gen de XIAP, adicionalmente a IRES de XIAP putativo de 163 nucleótidos. Las secuencias para cada constructo se confirmaron por secuenciación automatizada de ADN. Para generar vectores

45

lanzadera para la clonación en el replicón de VEE, las secuencias XIAP se transfirieron como un fragmento EcoRI en el sitio equivalente de pKS-rep2, generando los ADN pKS-rep2/XIAP1007 y pKS-rep2/XIAP241.

Tabla 2

XIAP-R	5'-CCCTGCTCGTGCCAGTGTTGATGC-3'
XIAP/IRES-1007	5'-ACACGTGGGGCAACCCTGATTTATGCCTGTTGTCC-3'
XIAP/IRES-241	5'-AGTAACTCAAAAAGAGAAAACAAAATGC
XIAP/IRES-R	5'-AGATATCTTCTCTTGAAAATAGGACTTGTCCAC-3'
Cap5'F	5'-GTTCCCGTTCAGCCAATGTATCCG-3'
13-87pr1	5'-GTCAGTAGTGACCACCATGT-3'
3-1.1pr1	5'-TAAGAGCCGCGAGCGATCCT-3'

5

1007 bp XIAP 5'NCR

ACACGTGGGGCAACCCTGATTTATGCCTGTTGTCCAGTGTGATTACT
 AGTGTAATTTTCACTTTGAGAAGTGTCCAGGTTTGGAGGATAAATTATCT
 TTCTAATAATTGATAACCCTTCTCATAACCTAACGGGTTCCCTTTAGTATTTT
 ATCTGGGTAAAATTACCAGCTGTAATTTGGCAGCTCTAATAAGACTGCA
 GCAATACTTATCTCCATTTGAACAGATTGTTACTTGACCAAGGGAAGTTA
 ATAGCAAAGTAACTGCAGGGCACATGTATGTCATGGGCAAAAAAAAAA
 AAGTAACAGCAATTAAGGTTTGCAGGTAAGTATTTTCTGAGCCACC
 CTCTAGAGGGCAGTGTTACATATATATCTGTAATTATCCAGTTACAACAAA
 AAAAGGGCTCTCATTTCATGCATGAAAATCAGAAATATTTCACTCTTAA
 AGAACACATTGGAACCAATATTATGATTAACATATTTTGCTAAGCAAA
 GAGATATTAATAATTAATTCATTAACATTCTGAACATTTTAACTTGTA
 AAACAACCTTTGATGCCTTGAATATATAATGATTCATTATAACAATTATGCA
 TAGATTTAATAATCTGCATATTTTATGCTTTCATGTTTTCTTAATTAATG
 ATTTGACATGGTTAATAATTATAATATATTCTGCATCACAGTTTACATATT
 TATGTAATAAAGCATTAAAAAATTATTAGTTTTATCTGCCTGCTTAAAT
 ATTACTTTCCTCAAAAAGAGAAAACAAAATGCTAGATTTTACTTTATGAC
 TTGAATGATGTGGTAATGTGCGAAGTCTAGTATTTAGAATTAGAATGTTTCT
 TAGCGGTCGTGTAGTTATTTTATGTCATAAGTGGATAATTTGTTAGCTCC
 TATAACAAAAGTCTGTTGCTTGTGTTTCACATTTTGGATTTCTAATATAAT
 GTTCTCTTTTATAGAAAAGGTGGACAAGTCCTATTTTCAAGAGAAGAT

10 Ejemplo 2. Construcción de vectores replicones mejorados.

A. Constructos que contienen la IRES de EMCV

15 Para demostrar la funcionalidad de una secuencia IRES colocada corriente abajo de un promotor funcional 26S de
 alfavirus, genes reporteros se subclonaron en el vector de transferencia pCDNA3.3/EMCV y después el casete del
 gen EMCV/reportero se movió en el vector replicón pERK. Experimentos iniciales se condujeron usando un vector
 replicón que expresa el gen reportero Cloranfenicol acetil transferasa (CAT). El gen CAT se amplificó usando
 cebadores F'-CAT (BamHI) y R'-CAT (XbaI) (Tabla 1). El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción
 BamHI y XbaI y se ligó en el ADN pCDNA3.3/EMCV linealizado con BamHI/XbaI, generando pCDNA3.3/EMCV/CAT.
 20 Después de que se confirmó la secuencia del gen CAT, el ADN pCDNA3.3/EMCV/CAT se digirió con la enzima de
 restricción AscI para liberar un fragmento EMCV/CAT de 1303 pb. El fragmento EMCV/CAT digerido con AscI se ligó
 después en el vector de ADN pERK linealizado con AscI, generando pERK/EMCV/CAT.

Se demostró que la IRES de EMCV tiene una actividad direccional y cuando está en la orientación incorrecta, con respecto a un NOI, ninguna traducción independiente de cap se observa (Roberts y Belsham (1997) *Virology* 227:53-62). Adicionalmente, la delección de las secuencias 5' terminales de la IRES de EMCV suprime la traducción independiente de cap en el contexto de un vector de expresión dicistrónico (Van der Velden y otros (1995) *Virology* 214: 82-90; Jang & Wimmer (1990) *Genes & Development* 4:1560-72). Para demostrar que la traducción independiente de cap del gen CAT está ocurriendo, se prepararon dos vectores pERK idénticos a pERK/EMCV/CAT, sólo con la IRES de EMCV en la orientación anti-sentido (pERK/anti-EMCV/CAT) o con una delección 5' de las secuencias terminales del IRES de EMCV (pERK/ Δ Avr/CAT).

Una versión antisentido de la IRES de EMCV se amplificó por PCR a partir de ADN pKS rep2/EMCV usando cebadores anti-En (EcoRI) y anti- En (BamHI) (Tabla 1). El fragmento IRES de EMCV amplificado se digirió con enzimas de restricción EcoRI y BamHI y se ligó en el ADN pKS-rep2 linearizado con EcoRI/BamHI, generando pKS-rep2/anti-EMCV. El gen CAT digerido con BamHI/XbaI descrito anteriormente, se ligó en el ADN pKS-rep2/anti-EMCV linearizado con BamHI/XbaI, generando pKS-rep2/anti-EMCV/CAT. El casete del gen anti-EMCV/CAT de 1295 pb se amplificó por PCR a partir de ADN pKS-rep2/anti-EMCV/CAT usando cebadores EMCVR(Ascl).1 y anti-En(Ascl) (Tabla 1). Por último, el fragmento anti-EMCV/CAT se digirió con enzima de restricción Ascl y se ligó en el ADN vector pERK linearizado con Ascl, generando pERK/anti-EMCV/CAT. La secuencia de la región del gen anti-EMCV/CAT se confirmó antes de que se llevaran a cabo experimentos adicionales.

Para generar el vector pERK Δ Avr/CAT, primero la delección Δ Avr se hizo en la IRES de EMCV encontrado en el vector intermedio pKS-rep2/EMCV. La delección se llevó a cabo por la digestión de ADN pKS-rep2/EMCV tanto con enzimas de restricción EcoRI como AvrII eliminando 145 pb de la región 5' del IRES de EMCV. El ADN linearizado se trató con T4 ADN polimerasa para crear extremos romos y volver a ligar para generar ADN pKS-rep2/ Δ Avr. El gen CAT se clonó en el vector intermedio ligando el gen CAT BamHI/XbaI descrito anteriormente en pKS-rep2/ Δ Avr linearizado con las enzimas de restricción BamHI y XbaI, generando ADN pKS-rep2/ Δ Avr/CAT. El casete del gen Δ Avr/CAT de 1177 pb se amplificó por PCR a partir de pKS-rep2/ Δ Avr/CAT. ADN usando cebadores EMCVR (Ascl) 1 y Δ Avr En(Ascl) R (Tabla 1). Por último, el fragmento Δ Avr/CAT se digirió con la enzima de restricción Ascl y se ligó en el ADN vector pERK linearizado con Ascl, generando pERK/ Δ Avr/CAT. La secuencia de la región del gen Δ Avr/CAT se confirmó antes de que se llevaron a cabo experimentos adicionales.

B. Constructos que contienen la IRES de EV71.

El elemento IRES de enterovirus humano 71 (EV71) (Thompson y Samow (2003) *Virology* 315: 259-266) se clonó tanto en orientaciones sentido como antisentido en vectores replicones espaciadores y analizó para la expresión de un gen reportero CAT. El elemento IRES de EV71 (cepa 7423/MS/87) se amplificó por PCR a partir de ADN pdc/MS (Thompson y Sarnow, 2003) usando cebadores para producir un fragmento sentido (dc/MS (EcoRI) F y dc/MS (BamHI) R) y un fragmento antisentido (dc/anti-MS (EcoRI) R y dc/anti-MS (BamHI) F) (Tabla 3). Los productos de PCR IRES de EV71-MS sentido y antisentido se digirieron con enzimas de restricción EcoRI y BamHI y se ligaron en pCDNA3.3 (ver el Ejemplo 1) linearizado con EcoRI y BamHI, generando pCDNA3.3/MS y pCDNA3.3/anti-MS. Las regiones IRES de EV71-MS, en cada uno de los vectores pCDNA3.3, se secuenciaron para verificar que no se introdujeron cambios de nucleótidos durante la amplificación por PCR antes de que se iniciaron experimentos adicionales.

El gen reportero CAT, como se describió anteriormente en A, se clonó en vectores pCDNA3.3/MS y pCDNA3.3/anti-MS linearizados con BamHI y XbaI, generando pCDNA3.3/MS/CAT y pCDNA3.3/anti-MS/CAT, respectivamente. Los constructos replicones espaciadores se produjeron digiriendo los ADN pCDNA3.3/MS/CAT y pCDNA3.3/anti-MS/CAT con enzimas de restricción Ascl y ligando los fragmentos Ascl de MS-CAT o anti-MS-CAT en vectores replicones espaciadores. La región espaciador-IRES-CAT de cada vector, se secuenció para verificar que no se introdujeron cambios de nucleótidos durante la clonación antes de que se realizaron experimentos adicionales.

Tabla 3

Cebador	Secuencia 5' - 3'
dc/MS(EcoRI) F	CGAATTCTTAAAACAGCTGTGGGTTG
dc/MS (BamHI) R	CGGGATCCGGTCAACTGTATTGAGGGTTAATATAAAG
dc/anti-MS(BamHI) F	CGGGATCCTTAAAACAGCTGTGGGTTGTTCCCAC
dc/anti-MS(EcoRI) R	GGAATTCGGTCAACTGTATTGAGGGTTAATATAAAG

C. Constructos que contienen la IRES de XIAP

El gen CAT se clonó en los sitios EcoRV y BamHI de pKS-rep2/XIAP1007 (ver Ejemplo 4 más abajo) después de la amplificación por PCR del gen usando cebadores CATF (5'-GGAGAAAAAATCACTGGATATAC-3') y CATR(Bam) (5'-GGGGATCCTTACGCCCGCCCTGCCAC-3'), generando pKS-rep2/XIAP/CAT 1007. Esta estrategia

reconstituye el sitio de inicio de gen XIAP silvestre. El producto intermedio se clonó después como un fragmento Apal/SphI en pERK para generar pERK/XIAP/CAT 1007. Después de la transcripción *in vitro* y electroporación en células Vero, se determinaron los rendimientos de VRP y expresión de la proteína CAT en las células infectadas y compararon con pERK/EMCV/CAT 342. Los rendimientos de VRP fueron equivalentes para ambos constructos. En este constructo particular, ha sido posible modificar el nivel de expresión de la proteína CAT usando el IRES de XIAP (3.97 e5 ng/μg), en comparación con la IRES de EMCV (1.08 e6 ng/μg), demostrando así la utilidad de diferentes IRES en la invención reivindicada.

D. Constructos que expresan HIVgp160

Se construyó un replicón que expresa el gen HIVgp160 subtipo C en el que la traducción de IHIVgp160 se dirigió a partir de IRES de EMCV. En este constructo, el espaciador de 167 pb a partir del constructo cooperador pH1500A/EMCV/Vcap (ver Ejemplo 4.B.1.) se clonó en un constructo replicón IRES de EMCV como sigue. El ADN pH1500A/EMCV/Vcap se digirió con la enzima de restricción Apal para liberar un fragmento de 194 pb que contiene el espaciador de 167 pb y una porción de la IRES de EMCV. Un vector pERK/EMCV 749 se digirió además con la enzima de restricción Apal y el fragmento Apal del espaciador de 749 pb liberado se sustituyó con el fragmento Apal del espaciador de 167 pb, generando el vector pERK/EMCV 167. Para demostrar que un gen heterólogo se puede además expresar de manera eficiente y empaquetar a partir del vector replicón pERK/EMCV 167, el gen de gp160 del HIV subtipo C (Williamson C y otros. (2003) AIDS Res Hum Retroviruses 19:133-44) se clonó en este vector como sigue. El gen gp160 de HIV se amplificó (usando cebadores env-5'-XbaI y DU151gp160 3' -XbaI) (Tabla 4) y se clonó en pCR-XL-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA), generando pCR-XL-TOPO/gp160. El gen gp160 se secuenció para asegurar que no se introdujeron errores durante la amplificación de PCR antes de iniciar estudios adicionales. El ADN pCR-XL-TOPO/gp160 se digirió con la enzima de restricción XbaI y después el fragmento de gp160 se ligó después en pCDNA3.3/EMCV, linearizado con XbaI generando pCDNA3.3/EMCV/gp160. El ADN pCDNA3.3/EMCV/gp160 se digirió con la enzima de restricción Ascl para liberar el fragmento EMCV/gp160. El fragmento EMCV/gp160 se ligó después en el ADN vector pERK/EMCV 167 linearizado con Ascl, generando el vector pERK/EMCV/gp160 167.

Tabla 4

Cebador	Secuencia 5'-3'
Env-5'-XbaI	CGACATAGTCTAGACCGCCAAGATGAGAGTGATGG
DU151gp1603'-XbaI	GATCTCTAGATTATTGCAAAGCTGCTTCAAAGCCC

E. Construcción de replicones IRES subgenómicos dobles que expresan múltiples NOIs

Se construyó un vector replicón IRES que codifica para dos casetes 26S-espaciador-IRES-NOI en serie. El vector base pERK usado para generar los replicones IRES subgenómicos dobles (pERKMCS2) incluyó una región espaciadora 342 pb corriente abajo del promotor 26S y codificó para los siguientes sitios de restricción en su MCS (5' Ascl, SnaBI, SphI 3').

La porción C -terminal de la cadena pesada (Hc) de neurotoxinas botulínicas A y B (BoNT A y BoNT B) se clonó en pCDNA3.3/EMCV como fragmentos BamHI/XbaI, generando pCDNA3.3/EMCV/BoNT A y pCDNA3.3/EMCV/BoNT B, respectivamente. Los genes BoNT se digirieron fuera de los vectores pCDNA3.3/EMCV con la enzima de restricción Ascl y los casetes Ascl EMCVBoNT se ligaron al ADN pERK MCS2 linearizado con Ascl, generando vectores monovalentes pERK/BoNT A MCS2 y pERK/BoNT B MCS2. La orientación del inserto se determinó por análisis de restricción y se aislaron los clones con insertos en la orientación sentido. Los genes IRES y BoNT de EMCV se secuenciaron para verificar que no se introdujeron errores durante la clonación antes de que se iniciaron experimentos adicionales.

Para generar el constructo replicón subgenómico doble BoNT AB IRES (pERK-BoNT A/B MCS2) se usaron los vectores monovalente pERK BoNT MCS2. El vector pERK/BoNT B MCS2 se digirió parcialmente con la enzima de restricción PspOM I y los extremos se hicieron romos usando T4 ADN polimerasa. El ADN pERK/BoNT B MCS2 se digirió adicionalmente con la enzima de restricción SphI para liberar un fragmento 26S-espaciador 342bp-EMCV-BoNT B. El fragmento 26S-espaciador 342 pb-EMCV-BoNT B se ligó después en ADN pERK/BoNT A MCS2 digerido con SnaBI/SphI, generando el vector pERK-BoNT A/B MCS2. La estructura final del constructo es 5' NCR-nsP1,2,3,4- 26S-espaciador 342bp -EMCV-Bont A -26S-espaciador 342 pb -EMCV-BoNT B-NCR 3'. La secuencia del replicón IRES subgenómico doble se verificó antes de que se condujeron los estudios de expresión y empaque.

f. Construcción de un replicón S.A. AR86 que contiene IRES

Un vector replicón derivado de S.A. AR86 (pRep89; descrito en Heise y otros J Virol. 2003 77(2):1149-56) se modificó para contener un casete espaciador-EMCV-HIV gag de 342 pb corriente abajo del promotor 26S. El fragmento espaciador-EMCV-HIV gag de 342bp se amplificó por PCR a partir de ADN pERK/EMCV/gag 342 usando el cebador relleno 342 (ClaI) y 3-42. pr4 (Tabla 5). La amplificación con el cebador 3-42.pr4 permite la

incorporación del sitio 3' Clal que existe justo corriente abajo del gen gag del HIV en el ADN pERK/EMCV/gag 342. El producto de PCR se digirió después con la enzima de restricción Clal y se ligó en pRep89 linearizado con Clal, generando el vector pRep89/EMCV/gag 342. La región insertada completa se secuenció para asegurar que no se habían introducido errores durante la amplificación de PCR.

5

Tabla 5

Cebador	Secuencia 5' - 3'
rellenador 342 (Clal)	CCATCGATCTATTCCAGAAGTAGTGAGG
3-42.pr4	CAATCGCCGCGAGTTCTATG

Ejemplo 3. Análisis de la expresión de NOI a partir de replicones dirigidos por IRES

10 A. Expresión de replicón IRES de EMCV

1: Expresión de CAT

15 La expresión de la proteína CAT se examinó usando constructos replicones pERK/EMCV/CAT, pERK/anti-EMCV/CAT, y pERK/ Δ Avr/CAT. Los replicones ARN encapsulados se transcribieron *in vitro* usando un estuche T7 RiboMax (Promega Corporation; Madison, WI; Núm. de Catálogo P1300). Los ARN se purificaron usando columnas de purificación RNeasy (Qiagen Corporación, Germantown, MD) siguiendo las instrucciones del fabricante. Células Vero (6×10^6 células) se suspendieron en 0.4 ml medio químicamente definido InVirus™, (Cell Culture Technologies GmbH, Zurich, CH; Núm. de Catálogo IVT) y electroporaron con 15 μ g ya sea de ARN pERK/EMCV/CAT o pERK/anti-EMCV/CAT usando un Pulsador Bio Rad Gene (BioRad Laboratories, Hercules, CA). Las células se pulsaron cuatro veces con el electroporador ajustado a 290 voltios y 25 microfaradios. La expresión CAT se detectó por IFA usando un anticuerpo de conejo anti-CAT en células fijadas con metanol y mediante ELISA usando lisados de células electroporadas y un estuche de ELISA CAT disponible en el comercio (Boehringer Mannheim , Indianapolis, IN).

25 Fragmentos de ADN al azar se clonaron entre la secuencia de IRES de EMCV y el promotor subgenómico de VEE en un sitio EcoRV único ubicado en los vectores pERK. Los pequeños fragmentos de ADN clonados entre el promotor 26S y el IRES de EMCV vinieron del ADN pCDNA3.1 (-) digerido con la enzima de restricción Alul. La enzima de restricción Alul frecuentemente corta dentro del ADN pCDNA3.1(-) resultando en fragmentos de extremos romos con intervalo en tamaño de 706 pb a 6 pb. Los fragmentos pCDNA3.1(-) digeridos con Alul se ligaron en los ADN pERK/EMCV/CAT, pERK/anti-EMCV/CAT, y pERK/ Δ Avr/CAT linearizados con EcoRV. Los clones individuales se secuenciaron para determinar qué fragmento del espaciador habían clonado en cada nuevo vector. El tamaño de algunos de los fragmentos de espaciadores que se encuentran en los vectores fue más grande que el más grande fragmento pCDNA3.1(-) Alul predicho, debido a la ligadura de múltiples fragmentos en la región del espaciador de estos replicones. Cada replicón espaciador-IRES se transcribió y el ARN se electroporó en células Vero como se describió anteriormente. La expresión de la proteína CAT se controló por ELISA de CAT y los resultados se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6 Análisis de la expresión de CAT de replicones que contienen IRES de EMCV.

Replicón	tamaño del fragmento espaciador	ng CAT/ μ g proteína total
pERK/anti-EMCV/CAT	133	2.1
pERK/EMCV/CAT	234	9.9
pERK/anti-EMCV/CAT	234	1.5
pERK/ Δ Avr/CAT	234	0.4
pERK/ Δ Avr/CAT	226	0.5
pERK/EMCV/CAT	342	10.3
pERK/anti-EMCV/CAT	357	0.1
pERK/EMCV/CAT	805	7.4
pERK/anti-EMCV/CAT	706	0.5
pERK/ Δ Avr/CAT	681	0.02

40 Los resultados indican que la expresión de CAT a partir de los constructos replicones pERK/IRES/CAT que contienen fragmentos espaciadores es robusta y dirigida por la IRES, en comparación con los vectores similares con ningún fragmento espaciador (aproximadamente 4-7 ng CAT/ μ g proteínas totales). Los más altos niveles de

expresión del gen heterólogo se produjeron cuando los fragmentos espaciadores mayores que aproximadamente 200 nucleótidos se introdujeron entre el promotor 26S y las secuencias de IRES de EMCV.

2. Expresión de NOI múltiple a partir de un único replicón

5 La expresión y empaque del replicón pERK-BoNT A/B MCS2 se llevaron a cabo en células Vero. El replicón ARN pERK-BoNT A/B encapsulado se transcribió y purificó como se describió anteriormente. Células Vero (1×10^8 células) se electroporaron con 30 μ g de replicón ARN, 30 μ g de ARN cooperador de la cápside y 30 μ g de ARN cooperador de glicoproteína. Las células electroporadas se analizaron por IFA usando anticuerpos de caballo anti-BoNT A y BoNT B (Perimmune, Rockville, MD) antes de que se cosecharon las VRP. Los resultados de la IFA y la titulación de VRP generados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Replicón	Anti-BoNT A IFA	Anti-BoNT B IFA	titulo VRP
pERK-BoNT A/B MCS2	Positivo	Positivo	2×10^9 VRP

3. Expresión de gp 160 de HIV

El replicón pERK/EMCV/gp160 167 (Ejemplo 2D) se analizó para la expresión del gen gp160 y la generación de VRP. El ARN purificado se preparó para el replicón, cooperador de GP y cooperador de la cápside como se describió anteriormente. Las células Vero se electroporaron con los ARN y VRP se recogieron 20 -24 horas post electroporación. Los resultados de IFA y la titulación de VRP se resumen en la Tabla 8. Para la comparación, se evaluó además un replicón pERK que expresa gp160 directamente a partir del promotor 26S.

Tabla 8

Replicón	Anti-gp160 IFA	Titulo VRP/ml
pERK/gp160	Positivo	2.1×10^8
pERK/EMCV/gp160 167	Positivo	2.5×10^8

4. Expresión de GAG de HIV a partir de un replicón S.A. AR86

El ADN pRep89/EMCV/gag 342 se transcribió *in vitro*, usando un estuche SP6 RiboMax (Promega Corporation; Madison, WI; Núm. de Catálogo P1280), para generar replicón ARN encapsulado. El ARN se purificó usando columnas de purificación RNeasy (Qiagen Corporación, Germantown, MD) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Células Vero (1×10^8 células) se electroporaron con 30 μ g de ARN Rep89/EMCV/gag 342 y se analizaron después para la expresión de la proteína Gag ~ 18 hr post electroporación. El análisis de IFA anti-Gag de células electroporadas con Rep89/EMCV/gag 342 fue positivo para la expresión de proteína Gag.

B. Expresión de replicón IRES de EV71-MS

La expresión de la proteína CAT a partir de cada replicón que contiene EV71-MS se llevó a cabo en células Vero. El replicón ARN encapsulado se transcribió y se purificó como se describió anteriormente. Las células Vero ($2-3 \times 10^7$ células) se electroporaron con 30 μ g del replicón ARN. Las células electroporadas se analizaron por IFA usando anti-CAT (Cortex Biochem, San Leandro, CA) y anticuerpos anti-VEE nsp2 (AlphaVax) aproximadamente 18 horas post electroporación. Adicionalmente, la expresión de CAT se controló por ELISA como se describió anteriormente. Los resultados de IFA y ELISA de CAT que comparan la actividad detectada a partir los replicones pERK/EMCV/CAT 342 y pERK/MS/CAT 342 se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

Replicón	Anti CAT IFA	Anti VEE nsp2 IFA	ng CAT/ μ g proteína	% reducción en la traducción
pERK/MS/CAT 342	+	+	20.1	NA
pERK/anti-MS/CAT 342	-	+	0.6	97%
pERK/EMCV/CAT 342	+	+	14.8	NA
pERK/ Δ Avr/CAT 342	-	+	0.0	>99%

Ejemplo 4. Traducción dirigida por IRES con diferentes espaciadores

A. Constructos Replicones

5 1. Constructos que contienen IRES de EMCV

Los pares de constructos replicones que codifican, ya sea para secuencias IRES de EMCV o antisentido-EMCV se prepararon que incluyeron exactamente la misma región espaciadora. Estas comparaciones demuestran que sólo las secuencias IRES de EMCV en la traducción directa independiente de cap de orientación sentido (es decir, en la orientación 5' - 3' en la cual se encuentra la secuencia en el virus), es decir, la traducción ocurre muy poco cuando el IRES está en una orientación anti-sentido, indicando que se requiere un elemento IRES orientado adecuadamente para obtener expresión significativa de CAT en estos constructos. Estos constructos replicones se prepararon como se describió anteriormente. Cada replicón espaciador-IRES se transcribió *in vitro* y 30 µg de cada ARN purificado se electroporó en ~ 1 x 10⁷ células Vero como se describió anteriormente. La expresión de la proteína CAT se controló por ELISA de CAT y los resultados se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10 Comparación de la expresión de CAT usando replicones IRES espaciador-EMCV o espaciador-anti-EMCV.

replicón	tamaño del fragmento espaciador	ng CAT/ µg proteína total	replicón	tamaño del fragmento espaciador	ng CAT/ µg proteína total	% reducción en la traducción*	Veces de incremento en la traducción [#]
EMCV/CAT	257	16.9	Anti-EMCV/CAT	257	3.1	82.7	5.5
EMCV/CAT	342	35.6	Anti-EMCV/CAT	342	0.2	99.4	178
EMCV/CAT	357	7.6	Anti-EMCV/CAT	357	0.4	94.7	19
EMCV/CAT	383	28.7	Anti-EMCV/CAT	383	0.6	97.9	48
EMCV/CAT	579	40.0	Anti-EMCV/CAT	579	0.3	99.2	133
EMCV/CAT	749	6.74	Anti-EMCV/CAT	749	0.03	99.5	224

*% de reducción en la traducción en los constructos IRES orientados anti-sentido en relación con los constructos dirigidos por IRES orientado en sentido.

[#]de aumento en veces en la traducción del elemento IRES orientado en sentido en relación con la traducción a partir de constructos con un elemento IRES orientado anti-sentido.

Los datos muestran que la expresión de la proteína CAT se redujo en gran medida (en la mayoría de los casos >95%) cuando el replicón incluyó un espaciador y un IRES de EMCV anti-sentido corriente arriba del gen CAT. Además, los datos demuestran la capacidad de un sistema de expresión de la proteína dirigido por IRES para optimizar el nivel de expresión de NOI. La optimización es específica a NOI, pero utilizando las enseñanzas de la presente descripción, la identificación de las combinaciones espaciador- IRES que proporcionan el nivel deseado de expresión para cualquier NOI determinado podrían ser de rutina para un experto en la técnica.

2. El uso de un espaciador derivado de una región 5' no codificante.

Un replicón pERK se diseñó para contener el gen completo de la proteína de la cápside del VEE amplificando por PCR la secuencia de la cápside a partir de pH500A/Vcap usando los cebadores Cap5'F y 3-1.1pr1 (Tabla 11). El producto de PCR resultante se insertó en los sitios de las enzimas de restricción EcoRV y SphI de pERK. "pERK/Cápside," se modificó para contener además una enzima de restricción única AscI en el extremo 3' del gen de la cápside usando los cebadores AscIF y AscIR (Tabla 11) para la mutagénesis sitio dirigida usando un estuche disponible en el comercio (Stratagene). Truncamientos en serie de la secuencia de la cápside del VEE se generaron después mediante amplificación por PCR de las secuencias de pERK/cápside usando un cebador directo (13-82.2.16) que se hibrida dentro del gen nsP4 y cebadores reversos (Tabla 11), que han sido diseñados para contener un sitio de la enzima de restricción AscI. Los productos de PCR se digirieron con ApaI y AscI o SwaI y AscI y se clonaron de nuevo en pERK/Cápside para generar pERK/Cap200, pERK/Cap400 y pERK/Cap600. Estos replicones conservan cantidades crecientes de la secuencia del extremo 5' del gen de la cápside para funcionar como un "espaciador" entre el promotor 26S y los constructos corriente abajo que se insertan. Para introducir un casete EMCV/CAT en cada uno de los vectores de pERK/Cap descritos anteriormente, el ADN pCDNA3.3/EMCV/CAT se digirió con la enzima de restricción AscI para liberar un fragmento EMCV/CAT de 1303 pb. El fragmento de

EMCV/CAT digerido con Ascl se ligó después en los ADN vector pERK/Cap linearizados con Ascl, generando pERK/EMCV/CAT Cap 200, pERK/EMCV/CAT Cap 400 y pERK/EMCV/CAT Cap600.

Tabla 11: Cebadores para generar replicones espaciadores de la cápside.

Cap5'F	5'-GTTCCCGTTCAGCCAATGTATCCG-3'
3-1.1pr1	5'-TAAGAGCCGCGAGCGATCCT-3'
AsclF	5'-CCGCGAGTTCTATGTAAGCGGCGCGCCAATTGTTAC AGACACATGGTGG-3'
AsclR	5'-CCACCATGTGTCTGTAACAATTGGCGCGCCGCTTACA TAGAACTCGCGG-3'
13-82.2.16	5'-GCTCTTTTTGCGAAGACACATAAT-3'
CAP200(Ascl)	5'-TTGGCGCGCCTTCTTCGGTTTCTTAGCGGATGGCCC-3'
CAP400(Ascl)	5'- TTGGCGCGCCCTTCCAACATGATTGGGAACG-3'
CAP600(Ascl)	5'- TTGGCGCGCCTGTAATAGCCTTGGGGTTTCTCATGGG-3'

5 Estos replicones, que contienen porciones de la región 5' del gen de la cápside de VEE, se linearizaron, transcribieron *in vitro*, electroporaron en células Vero y analizaron para la expresión de la proteína CAT por IFA y ELISA. La expresión de la proteína CAT se verificó por IFA usando anticuerpos específicos para CAT; sin embargo, la intensidad de inmunofluorescencia varió dependiendo de la longitud del espaciador del gen de la cápside usado. Estos resultados se reflejan en el ELISA de CAT (Tabla 12).

Tabla 12: Expresión de la proteína Cat de replicones que contienen espaciadores de genes de la cápside

Constructo	CAT IFA	nsP2 IFA	Proteína CAT
pERK/EMCV/CAT Cap 200	75%	95%	29 ng/μg prot. total
pERK/EMCV/CAT Cap 400	60%	95%	2 ng/μg prot. total
pERK/EMCV/CAT Cap 600	60%	95%	5 ng/μg prot. total
pERK/EMCV/CAT 342	50%	50%	14 ng/μg prot. total

B. Constructos cooperadores

1. Constructos que comprenden el IRES de EMCV

Los cooperadores que se construyeron expresaron individualmente ya sea los genes de la glicoproteína de VEE ("GP") o el gen de la cápside de VEE. En un principio, se generaron dos vectores esqueletos cooperadores vacíos para facilitar la construcción de la cápside que contiene espaciador-IRES y cooperadores GP. Un cooperador vacío se generó por la digestión del vector pERK con las enzimas de restricción Apal y RsrII para eliminar 6989 pb de la región de codificación de la proteína no estructural. El ADN se trató con T4 ADN polimerasa para producir extremos romos antes de ligar el vector pERK suprimido con el gen no estructural para producir pH500G. El cooperador vacío pH500G incluyó aproximadamente 500 nucleótidos de la región 5' no codificante (NCR). El segundo cooperador vacío se generó por la digestión del vector pERK con las enzimas de restricción Swal y RsrII para eliminar 6449 pb de la región de codificación de la proteína no estructural. El ADN se trató con T4 ADN polimerasa para producir extremos romos antes de ligar el ADN, generando pH1500G. El cooperador vacío pH1500G incluyó aproximadamente 1500 nucleótidos de 5' NCR, incluyendo unos 540 pb adicionales del gen nsp4 inmediatamente corriente arriba del promotor 26S que no está presente en el cooperador pH500G. Los constructos cooperadores vacíos se prepararon además que codificaron para un residuo A en lugar de un G en el nucleótido 3 (pH500A y pH1500A). Estos constructos se prepararon por subclonaje de la región 5' NCR de una cápside cooperadora (pH500A/Vcap), que contiene una A en el nucleótido 3, en lugar de la misma región en pH500G y pH1500G. Esto se logró digiriendo pH500A/Vcap con las enzimas de restricción XbaI y SacI, recogiendo el fragmento de 430 pb y ligándolo en los ADN pH500G y pH1500G digeridos con XbaI y SacI, generando pH500A y pH1500A respectivamente.

Los genes de la cápside y GP se clonaron en pCDNA3.3/EMCV y pKS-rep2/anti-EMCV como fragmentos BamHI y XbaI como se describió anteriormente. Los casetes EMCV/cápside, anti-EMCV/cápside, EMCV/GP y anti-EMCV/GP

ES 2 453 344 T3

se clonaron en los constructos cooperadores vacíos pH500G, pH500A , pH1500G y pH1500A como fragmentos Ascl como se describió anteriormente. La secuencia de cada cooperador se confirmó antes de que se iniciaron experimentos adicionales.

5 Fragmentos espaciadores aleatorios se clonaron entre el promotor 26S y la IRES de EMCV o anti-EMCV en cada cooperador en un sitio EcoRV único como se describió previamente. La secuencia y la longitud de los fragmentos espaciadores insertados se determinó para cada nuevo cooperador, y el longitud del inserto espaciador se incluye al final de la designación del constructo. Los espaciadores #15, 16, y 22 además no se caracterizaron. Los constructos pH500A/EMCV/GP y pH500A/anti-EMCV/GP no contienen espaciador.

10 2. Empaque y Títulos usando Combinaciones Cooperadoras de GP y/o Cápside que contienen IRES de EMCV.

15 Varias combinaciones de los cooperadores de GP y de la cápside se usaron para empaquetar un replicón de VEE que expresa la proteína Gag del HIV, pERK-342/EMCV/gag (ver el Ejemplo 7 para una descripción de la construcción de este replicón). Para los resultados presentados en la Tabla 13, 30 µg de cada ARN cooperador y 30 µg del ARN replicón se co-electroporaron en células Vero en una cubeta de electroporación de 0.8 ml usando 4 pulsos a 580 V y 25 µF, y las células se dejaron recuperar a temperatura ambiente por 10 min. Las células electroporadas se sembraron en frascos T-175 que contienen 50 ml de EMEM (10 % de FBS) con antibióticos y se incubaron a 37 °C. Después de 20-24 horas, las partículas de replicones de VEE ("VRPs") se recogieron y titularon sobre células Vero en placas de 96 pocillos midiendo la expresión de proteína GAG usando un ensayo de inmunofluorescencia (IFA). El rendimiento de VRP (Tabla 13) de cada electroporación se expresa sobre una base "IU/ml", para propósitos comparativos.

Tabla 13

Cooperador de Cápside	Cooperador GP	Rendimiento de VRPs (IU/ml)
pH500A/EMCV/Vcap 384	pH500A/EMCV/GP 393	1.6 e6
pH500A/EMCV/Vcap 291	pH500A/EMCV/GP 393	1.32 e6
pH1500A/EMCV/Vcap 167	pH500A/EMCV/GP 393	1.51 e6
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP 393	1.92 e5
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP #15	2.35 e5
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP #16	5.55 e5
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP #22	1.15 e6
pH500A/EMCV/Vcap 291	pH500A/EMCV/GP 291	2.22 e6
pH1500A/EMCV/Vcap 167	pH500A/EMCV/GP 291	5.16 e6
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP 291	1.75 e5
pH500A/EMCV/Vcap 291	pH500A/EMCV/GP	1.00 e7
pH1500A/EMCV/Vcap 167	pH500A/EMCV/GP	6.20 e7
pH500A/EMCV/Vcap 384	pH500A/EMCV/GP 376	2.99 e5
pH500A/EMCV/Vcap 291	pH500A/EMCV/GP 376	1.49 e5
pH1500A/EMCV/Vcap 167	pH500A/EMCV/GP 376	1.71 e5
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP 376	8.53 e4
pH500A/EMCV/Vcap 384	pH500A/EMCV/GP 342	8.11 e5
pH500A/EMCV/Vcap 291	pH500A/EMCV/GP 342	8.32 e5
pH1500A/EMCV/Vcap 167	pH500A/EMCV/GP 342	1.07 e6
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP 342	1.92 e5
pH500A/EMCV/Vcap 291	pH500A/GP	3.56 e8
		1.00 e8
pH1500A/EMCV/Vcap 167	pH500A/GP	1.13 e8

Cooperador de Cápside	Cooperador GP	Rendimiento de VRPs (IU/ml)
		2.37 e7

En otros experimentos, la cantidad de ARN cooperador GP se varió en el medio de electroporación; todas las demás condiciones para la producción de VRP fueron como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

5

Tabla 14

Cooperador de la Cápside	Cooperador GP	µg ARN GP	Rendimiento VRP (IU/ml)
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP 393	45	1.51 e6
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP 393	60	2.24 e6

3. Cooperadores 26S-IRES GP sin un Espaciador

10 Este experimento se realizó para ver si un espaciador se requirió en el Cooperador GP para desacoplar la transcripción de la traducción. Las células Vero se electroporaron por separado con cada una de las siguientes mezclas:

- 15 a. Vector Replicón Gag (ver Ej. 6) + pH500A/anti-EMCV/GP + pH500A/anti-EMCV/Vcap 291
 b. Vector Replicón Gag + pH500A/EMCV/GP + pH500A/EMCV/Vcap 291

Las células se incubaron como se describió previamente para permitir la producción de VRP y VRPs se recogieron y titularon en células Vero por IFA. En el caso de los cooperadores con las IRES en la orientación sentido (la mezcla "b"), el rendimiento de VRP fue 3.3 e6, mientras que en el caso de los cooperadores en los que la IRES se coloca en la orientación anti-sentido, el rendimiento de VRP fue 5.3 e2.

20

4. Producción y Uso de constructos cooperadores VEE que contienen la IRES de XIAP

25 Los genes de la cápside de VEE ("VCap") y glicoproteína ("VGP") se amplificaron por PCR a partir de pH500A/Vcap y pH500A/GP, respectivamente, usando pol PFU (Stratagene; La Jolla, CA) y cebadores directos Cap5'F o 13-87pr1 y cebadores reversos 3-1.1pr1 (Tabla 2, ver el Ejemplo 1B). Los productos de PCR resultantes se clonaron en los sitios EcoRV y SphI de pKS- rep2. Esta estrategia reconstituye el codón de inicio de la proteína estructural del VEE en el inicio del gen de XIAP de tipo silvestre. La secuencia de la proteína estructural del VEE en cada plásmido se verificó por secuenciación automatizada de ADN, y los plásmidos resultantes se usaron para la transcripción *in vitro*.
 30 El ARN se purificó usando columnas Qiagen RNeasy y electroporó en células Vero para el análisis de la expresión de la proteína y el empaque. Todos los cooperadores expresaron ya sea cápside o glicoproteínas de VEE según se determinó por IFA, y los títulos se recuperaron de un replicón VEE que expresa la proteína GAG de HIV que osciló de 1x10⁵ a 1x10⁷ total.

35 El constructo de la proteína estructural XIAP 1007-VEE descrito anteriormente se clonó además en un segundo plásmido cooperador, pH1500A, como un fragmento de ADN Apal/SphI, generando pH1500A/XIAP/Vcap 1007 y pH1500A/XIAP/GP 1007. Estos plásmidos se usaron para preparar ARN y electroporaron en células Vero como anteriormente para analizar la expresión de la proteína y el empaque de VRP. De nuevo, los cooperadores resultantes, expresaron ya sea cápside o glicoproteína de VEE según se determinó por IFA, y los títulos oscilaron de 1x10⁸ hasta por encima de 1x10⁹ total de VRP, demostrando el aumento a partir de la transcripción del ARNm subgenómico del promotor 26S.

40

Ejemplo 5.

45 El análisis Northern se llevó a cabo sobre el ARN celular total recogido de células Vero en las que se electroporaron los replicones de ARN. Los constructos replicones espaciador-IRES se transcribieron *in vitro* y 30 µg de ARN purificado en columna RNeasy se electroporó en aproximadamente 1x10⁷ células Vero, como se describió anteriormente. Las células electroporadas se resuspendieron en 10 ml de medio DMEM, 7 ml (aproximadamente 7x10⁶ células) se sembraron después en un frasco de 25 cm². El ARN celular total se recogió de las células 16 h post electroporación usando un estuche de extracción RNAwiz (Ambion) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Los ARN se cuantificaron y 10 µg de cada uno se corrieron en un gel de agarosa glioxal 1% antes de que transfirieron a una membrana de Brightstar-Plus (Ambion) por transferencia pasiva. Los ARN se reticularon por UV a la membrana, bloquearon con solución UltraHyb (Ambion) por 1 hora a 45 °C, y se sondearon durante toda la noche con solución ULTRAhyb que contiene un cebador anti-sentido biotinilado (3' UTR4Xbiotin, Tabla 1) específico para el 3' UTR del ARN subgenómico de VEE (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) 45 °C. Después de la hibridación durante toda la noche la mancha se procesó por la detección de ARN quimioluminiscente usando un estuche de Brightstar Biodetect (Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante y la visualización con un Epi II Chemi Darkroom (UVP, Inc., Upland, CA). Los resultados del análisis Northern de ARN a partir de células Vero

55

electroporadas con pERK/EMCV/CAT 257, pERK/anti-EMCV/CAT 257, pERK/EMCV/CAT 579, o pERK/anti-EMCV/CAT 579 se muestran en la Figura 1. Tanto los constructos replicones de EMCV como anti-EMCV produjeron transcritos subgenómicos de casi la misma intensidad, indicando que la falta de expresión de la proteína CAT a partir de los constructos replicones espaciador-anti-EMCV/CAT no se debió a cualquier reducción sustancial en los ARN subgenómicos.

Ejemplo 6. Construcción de un vector replicón dirigido por IRES del gen gag de HIV

Un gen gag de HIV subtipo C se clonó en el vector pERK/EMCV que contiene un espaciador de 342 pb (pERK-342), como se describió anteriormente. El gen gag se amplificó por PCR a partir de ADN pERK/HIV_{gag} usando los cebadores GAG-F y GAG-R (Tabla 1). Los cebadores se diseñaron para incluir los sitios de restricción BamHI tal que el producto de PCR pueda codificar para este sitio en los extremos 5' y 3'. El producto de PCR se digirió con la enzima de restricción BamHI y ligó en el ADN pCDNA3.3/EMCV linearizado con BamHI. La orientación del gen gag se determinó por análisis de restricción y un constructo con el gen en la orientación correcta se seleccionó, generando pCDNA3.3/EMCV/gag. El casete del gen EMCV/gag se digirió a partir de ADN pCDNA3.3/EMCV/gag con la enzima de restricción AsclI y ligó en el ADN pERK-342 linearizado con AsclI. La orientación del casete del gen EMCV/gag se determinó por análisis de restricción y un constructo con el gen en la orientación correcta se seleccionó, generando pERK-342/EMCV/gag. La secuencia de la región EMCV/gag se verificó antes de que se iniciaron experimentos adicionales.

El análisis de la expresión de la proteína gag, por IFA y Membrana de Western, indicaron que la proteína expresada bajo la dirección de la IRES en el replicón pERK-342/EMCV/gag es indistinguible de la proteína expresada a partir de un replicón pERK/HIV_{gag} en el que tanto la traducción como transcripción se dirigen por el promotor subgenómico 26S de VEE. Adicionalmente, el nivel de expresión, según se midió por titulación de VRP, se aumentó con el sistema dirigido por IRES en comparación con el sistema dirigido por el promotor 26S (Tabla 15).

Tabla 15. Comparación de títulos de VRP generados con diferentes vectores replicones

Vector Replicón	título VRP
pERK/HIV _{gag}	4.0 x 10 ⁸ IFU
pERK-342/EMCV/gag	5.3 x 10 ⁸ IFU

Ejemplo 7. Respuesta inmune humoral y celular en ratones inoculados con partículas de replicones de HIV_{gag} dirigido por IRES.

El replicón pERK/EMCV/gag 342 induce respuestas humorales y celulares robustas cuando se vacunan en animales. Ratones hembra BALB/c de cuatro a cinco semanas de edad se obtuvieron de Charles River y se aclimataron por una semana antes de cualquier procedimiento. Para el primero y el refuerzo, grupos de ratones se inocularon tanto en ambas almohadillas de las patas traseras bajo anestesia con isoflurano con una dosis objetivo de 5 x 10⁵ IFU de VRP en diluyente que contiene PBS con 1% v/v de albúmina de suero humano y 5% p/v de sacarosa. Las inyecciones de la almohadilla de la pata se realizaron con una aguja 30.5 G y una jeringa Hamilton de 0.100 ml por inyección de 20 µl en cada almohadilla de la pata trasera. Las muestras de suero se obtuvieron por sangrado retro-orbital bajo anestesia con isoflurano antes de la primera inoculación en el Día 0 (antes del sangrado), Día 21 (20 días después de la inoculación primaria) y Día 29 (7 días después del refuerzo). El programa de vacunación se resume en la Tabla 16. Los bazos se cosecharon 14 días después del refuerzo para los ensayos de IFN-γ ELISPOT

Tabla 16 Programa de vacunación de VRP replicón dirigido por IRES

Grupo	N	Cepa de ratón	Vacuna VRP	Dosis, IFU	Ruta	Día de Inoculación	Día de muestreo del suero
1	5	BALB/ c	EMCV/Gag 342 ²	5x10 ⁵	sc-fp ⁴	Día 1 & 22	Día 0, 21, 29
2	5	BALB/c	EMCV/Gag 342 ²	5x10 ⁵	sc-fp ⁴	Día 1 & 22	Día 0, 21, 29
3	5	BALB/c	Control VRP ³	5x10 ⁵	sc-fp ⁴	Día 1 & 22	Día 0, 21, 29

1: VRP Gag fabricado GMP preparado con vector replicón pERK sin modificar
 2: 342 se refiere al número de nucleótidos en el espaciador corriente arriba del casete IRES/Gag.
 3: VRP control consiste de replicones que expresan un gen Pol/Nef de HIV.
 4: sc-fp se refiere a la almohadilla de la pata por vía subcutánea

A. Ensayos inmunológicos se realizaron después de la vacunación

Gag ELISA: Se usó como recubrimiento antigénico p55 recombinante purificada marcada con histidina (his) a partir del aislado DU-422 del HIV-1 subtipo C. Los sueros se evaluaron para la presencia de anticuerpos específicos a Gag por un ELISA indirecto estándar.

Ensayo Gag ELISPOT: Linfocitos viables cosechados a partir de bazos se sembraron en pocillos individuales del ensayo ELISPOT en una placa Multiscreen Immobilon -P ELISPOT (placa de filtración de 96 pocillos certificada ELISPOT, Millipore, Bedford, MA) que había sido pre-recubierta con un anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ AN18 (IgG1 de rata, Mabtech, Mariemont, OH), y se incubó por 16-20 horas. Las células se eliminaron por múltiples lavados con tampón y los pocillos se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ biotinilado R4-6A2 (IgG1 de rata, Mabtech), seguido por el lavado e incubación con Complejo avidina-peroxidasa (Vectastain ABC Estuche peroxidasa, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Para permitir formar el complejo, el Complejo Avidina-Peroxidasa se preparó al menos 30 minutos antes de la finalización del periodo de incubación con el anticuerpo secundario y se almacenó a temperatura ambiente. Después de la incubación, los pocillos se lavaron e incubaron por 4 minutos a temperatura ambiente con sustrato (comprimidos AEC, Sigma) para facilitar la formación de manchas, que representan las posiciones de las células individuales secretoras de IFN- γ durante el cultivo. El desarrollo de manchas se detuvo por enjuague con agua destilada.

Para enumerar las células secretoras de IFN- γ específicos a Gag en los linfocitos de ratones inmunizados con VRP HIV_{gag}, los linfocitos se estimularon con CD8 + inmunodominante CTL H -2K^d-restringido a péptido Gag de HIV AMQMLKETI o un HA irrelevante (hemaglutinina de la influenza) CD8+ CTL H -2K^d-restringido a péptido IYSTVASSL que se une al MHC de clase I, por 16 a 20 horas (5% de CO₂ a 37 °C). Las células menos péptido sirven como un control de fondo. Como un control positivo, las células se estimularon con 4 μ g/ml de Concanavalina A por un período de tiempo similar. Los péptidos se sintetizaron con extremos libres y se purificaron a >90% mediante New England Peptide.

Titulación de la Potencia de VRP HIV_{gag}: Un IFA específico a Gag de células Vero infectadas con VRP HIV_{gag} se usó para medir la potencia o título infeccioso de las vacunas. La potencia se mide como unidades infecciosas por ml, IFU/ml. En el día de cada inyección los inóculos residuales se volvieron a titular para determinar la dosis presente que cada animal recibió (Tabla 17).

Tabla 17 resumen de los resultados de Gag ELISA y ELISPOT

Ratón #	Vacuna VRP HIV	Dosis de Inoculaciones (IFU)		Títulos del Ac Gag			ELISPOT ¹ (SFC/1e6 linfocitos)
		Primer Día 1	Día del refuerzo 22	Día pre-sangrado -1	7 Días Post Día del refuerzo 29	GMT ²	14 Días Post Día del refuerzo 36
1-1	EMCV/gag 342	6.8e5	4.4e5	<40	20480	23525	341
1-2				<40	40960		
1-3				<40	20480		
1-4				<40	20480		
1-5				<40	20480		323
2-1	EMCV/gag 342	1.2e6	5.6e5	<40	5120	13512	438
2-2				<40	10240		
2-3				<40	10240		
2-4				<40	20480		
2-5				<40	40960		741
3-1	control VRP	2.8e5	2.2e5	<40	<40		7
3-2				<40	<40		
3-3				<40	<40		

Ratón #	Vacuna VRP HIV	Dosis de Inoculaciones (IFU)		Títulos del Ac Gag			ELISPOT ¹ (SFC/1e6 linfocitos)
		Primer Día 1	Día del refuerzo 22	Día pre-sangrado -1	7 Días Post Día del refuerzo 29	GMT ²	
3-4				<40	≥ 40 (OD=0.32).		46
3-5				<40	≥ 40 (OD=0.32)		

1: linfocitos SFC/1e6 se refieren a células formadoras de mancha por 1×10^6 linfocitos
 2: GMT, título de la media geométrica

Los resultados del estudio de vacunación indican que los animales vacunados con VRP 342/EMCV/gag montan una respuesta inmune humoral y celular robusta para Gag de HIV, tal como se mide por ELISA de anticuerpo anti-gag y ensayos ELISPOT específicos para Gag.

5

Ejemplo 8.

La actividad de varias secuencias IRES de virus de insecto se comparó con la actividad de un IRES de virus de mamífero (EMCV) en un número de líneas celulares de insecto. Los vectores replicones se diseñaron tal que el transcrito subgenómico 26S podría ser bi-cistrónico. El ARN subgenómico 26S se encapsula, lo que significa que la traducción del primer gen en el ARN bicistrónico (Cloranfenicol acetil transferasa (CAT)) es dependiente de cap mientras que la traducción del segundo gen (luciferasa (LUC)) es dependiente de la secuencia IRES. Vectores replicones basados en virus Sindbis se diseñaron para contener los siguientes elementos: 5'NCR, nsp1,2,3,4, promotor 26S, gen CAT, IRES, gen LUC, NCR 3'. Dos secuencias IRES de virus de insecto, una derivada a partir de virus *Acyrtosiphon pisum* (APV) y el otro a partir de virus *Rhopalosiphum padi* (RhPV), se diseñaron entre los genes CAT y LUC. Para la comparación, un IRES del virus de mamífero (EMCV) se diseñó entre los genes CAT y LUC en el mismo vector replicón Sindbis. El ARN para cada constructo replicón y un ARN cooperador que codifica para todos los genes de las proteínas estructurales de Sindbis (cápside -E3-E2-6K-E1) se transcribieron *in vitro* usando ARN polimerasa SP6. Partículas de replicones de Sindbis se prepararon por electroporación del ARN cooperador y cada uno de los ARN replicón bicistrónicos en 8×10^6 células BHK-21. El medio se recogió, clarificó, y las partículas de replicones se purificaron por centrifugación a través de un cojín de sacarosa 20% (24,000 RPM por 3 horas a 4 °C). Las partículas de replicones se titularon usando un anticuerpo de conejo anti-CAT (Cortex Biochem, San Leandro, CA).

10

15

20

25

30

35

40

Para determinar la actividad de las secuencias IRES de virus de insecto en comparación con el IRES de EMCV, se usaron partículas de replicones bi-cistrónicos de Sindbis purificadas para infectar una serie de células diferentes de insecto que crecen en cultivo. Las células de insecto usadas en estos experimentos fueron: *Toxorhynchites amboinensis*, *Anopheles albimanus*, *Anopheles gambiae*, y *Aedes albopictus*. Las células de insecto se infectaron a una MOI de 0.1 con partículas de replicones bi-cistrónicos. Aproximadamente 16 horas post infección los lisados celulares se prepararon y la cantidad de proteína CAT presente en los lisados se determinó usando un estuche ELISA CAT (Roche, Indianápolis, IN) siguiendo las instrucciones del fabricante. En paralelo, la cantidad de proteína LUC presente en los lisados se determinó usando un estuche de ensayo de luciferasa (Roche). La cantidad de CAT y LUC detectada en cada lisado se normalizó para la cantidad de proteína usada en cada ensayo para permitir la comparación de los dos valores (Tabla 17). La proteína CAT detectada en cada tipo de células fue similar, independientemente del replicón usado. Estos datos indican que las eficiencias de infección similares se alcanzaron dentro de un tipo de célula para cada una de las tres IRES que contienen partículas de replicones, y así la actividad LUC detectada en cada tipo de célula refleja directamente la actividad de la secuencia IRES en ese tipo de célula. En cada uno de los tipos de células de insectos analizados, la IRES de virus de insecto tuvo más actividad (85-95% más) que el IRES de EMCV (Tabla 17).

Tabla 17 comparación de la actividad de IRES de virus de insectos (APV o RhPV) y actividad de IRES de virus de mamífero (EMCV) en diferentes tipos de células de insectos.

Tipo de célula del insecto	IRES analizado	ng CAT/ µg proteína	actividad LUC (RLU)/µg proteína	% diferencia de EMCV
<i>Tox. amboinensis</i>	APV	2.0	290.5	88%
<i>Tox. amboinensis</i>	RhPV	2.1	231.4	85%
<i>Tox. amboinensis</i>	EMCV	1.6	33.1	0%
<i>An. Albimanus</i>	APV	2.9	497.7	93%

Tipo de célula del insecto	IRES analizado	ng CAT/ µg proteína	actividad (RLU)/µg proteína	LUC	% diferencia de EMCV
<i>An. Albimanus</i>	RhPV	2.0	468.6		93%
<i>An. Albimanus</i>	EMCV	2.3	31.8		0%
<i>An. gambiae</i>	APV	1.8	525.7		95%
<i>An. gambiae</i>	RhPV	1.7	283.6		91%
<i>An. gambiae</i>	EMCV	1.8	24.2		0%
<i>Ae. albopictus</i>	APV	4.8	87.3		93%
<i>Ae. albopictus</i>	RhPV	4.1	119		95%
<i>Ae. albopictus</i>	EMCV	4.7	5.7		0%

Ejemplo 9. Respuestas inmune humoral y celular a un replicón IRES en primates.

5 Un estudio sobre la inmunogenicidad de VRPs que contienen pERK/EMCV/gag 342 (Ejemplo 6) se condujo además en macacos cynomolgus en el Instituto de Investigación del Sur en Frederick, MD. Cada vacuna se administró a seis animales por inyección subcutánea e intramuscular (tres animales/ruta). Los animales recibieron dos inoculaciones de 1×10^8 partículas de vacunas en 0 y 1 mes. Se analizaron las respuestas inmunes humorales 4 semanas después de la segunda inoculación (como se describió en el Ejemplo 7A), y se presentan en la Tabla 18. Para la comparación, se evaluó además un replicón de VEE que expresa la proteína gag directamente a partir del promotor 26S (pERK /gag).

Tabla 18

Constructo	Ruta	ELISA GMT
pERK/EMCV/gag 342	subcutáneo	1613
pERK/EMCV/gag 342	Intramuscular	640
pERK/gag	subcutáneo	403
pERK/gag	Intramuscular	1280

15 Aunque el presente proceso ha sido descrito con referencia a detalles específicos de ciertas modalidades de la misma, no se pretende que tales detalles se consideren como limitaciones del alcance de la invención excepto como y en la medida en que estén incluidos en las reivindicaciones adjuntas.

20 A lo largo de esta solicitud, varias patentes, publicación de patente, publicaciones en revistas y otras publicaciones se referencian Las descripciones de estas publicaciones en su totalidad se incorporan como referencia en esta solicitud para describir más completamente el estado de la técnica a la que esta invención pertenece y proporcionar la descripción escrita de la materia de la cláusula en las que estas referencias aparecen en esta aplicación.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico replicón recombinante que comprende:
 - (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de reconocimiento de la replicación del 5' alfavirus;
 - (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del alfavirus no estructural;
 - (c) un casete promotor subgenómico de alfavirus-IRES-ácido nucleico heterólogo de interés (NOI), que está en orientación 5' a 3'; y
 - (d) un ácido nucleico que codifica una secuencia de reconocimiento de la replicación del 3' alfavirus.
2. El ácido nucleico replicón recombinante de la reivindicación 1, en donde el casete promotor subgenómico de alfavirus-IRES-NOI heterólogo comprende además una secuencia de ácido nucleico no codificante espaciadora situada 3' al promotor subgenómico de alfavirus y 5' al IRES.
3. Un ácido nucleico replicón recombinante de la reivindicación 1 o 2, en donde la secuencia de ácido nucleico de (b) es una secuencia de nucleótidos contigua que codifica para las proteínas no estructurales de alfavirus nsp1, nsp2, nsp3 y nsp4.
4. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 1 o 2, en donde la secuencia de ácido nucleico de (b) es una secuencia de nucleótidos contigua que codifica para las proteínas no estructurales de alfavirus nsp1, nsp2 y nsp3 y en donde el ácido nucleico replicón recombinante comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína no estructural de alfavirus nsp4 que no es contigua con la secuencia de ácido nucleico de (b).
5. El ácido nucleico replicón recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el IRES se selecciona del grupo que consiste de IRES celulares, IRES de plantas, IRES de virus de mamífero, IRES sintéticos y IRES de virus de insectos.
6. El ácido nucleico replicón recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el promotor subgenómico de alfavirus de (c) es un promotor subgenómico de alfavirus mínimo o modificado.
7. El ácido nucleico replicón recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el NOI heterólogo de (c) codifica una proteína o péptido.
8. El ácido nucleico replicón recombinante de la reivindicación 7 en donde el péptido es un Inmunógeno.
9. El ácido nucleico replicón recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el NOI heterólogo de (c) es una secuencia antisentido.
10. El ácido nucleico replicón recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el NOI heterólogo de (c) codifica un ribozima.
11. El ácido nucleico replicón recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural de alfavirus.
12. El ácido nucleico replicón recombinante de la reivindicación 11, en donde la proteína estructural de alfavirus es de un alfavirus seleccionado del grupo que consiste de virus Sindbis, SFV, VEE, virus S.A. AR86, virus Ross River, EEE y WEE.
13. El ácido nucleico replicón recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la secuencia de ácido nucleico de (a) es de un alfavirus seleccionado del grupo que consiste de virus Sindbis, SFV, VEE, virus S.A. AR86, virus Ross River, EEE y WEE.
14. El ácido nucleico replicón recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la secuencia de ácido nucleico de (b) es de un alfavirus seleccionado del grupo que consiste de virus Sindbis, SFV, VEE, virus S.A. AR86, virus Ross River, EEE y WEE.
15. El ácido nucleico replicón recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el promotor subgenómico del alfavirus de (c) es de un alfavirus seleccionado del grupo que consiste de virus Sindbis, SFV, VEE, virus S.A. AR86, virus Ross River, EEE y WEE.

16. El ácido nucleico replicón recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido nucleico de (d) es de un alfavirus seleccionado del grupo que consiste de virus Sindbis, virus SFV, VEE, S.A. AR86, virus Ross River, EEE y WEE.
- 5 17. El ácido nucleico replicón recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido nucleico es ARN.
18. El ácido nucleico replicón recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido nucleico es ADN.
- 10 19. El ácido nucleico replicón recombinante de la reivindicación 2, en donde la secuencia de ácido nucleico no-codificante espaciadora es al menos 30 nucleótidos de longitud.
- 15 20. El ácido nucleico replicón recombinante de la reivindicación 2, en donde la secuencia de ácido nucleico no-codificante espaciadora está entre 25 y 7500 nucleótidos de longitud.
21. El ácido nucleico replicón recombinante de la reivindicación 2, en donde la secuencia de ácido nucleico no-codificante espaciadora está entre 25 y 1000 nucleótidos de longitud.
- 20 22. El ácido nucleico replicón recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende una mutación de atenuación.
23. Un ácido nucleico replicón recombinante que comprende:
- 25 (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de reconocimiento de la replicación del 5' alfavirus;
- (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína del alfavirus no estructural;
- (c) un primer casete promotor subgenómico de alfavirus-IRES-NOI heterólogo, que está en la orientación 5' a 3';
- 30 (d) un segundo casete promotor subgenómico de alfavirus-IRES-NOI heterólogo, que está en la orientación 5' a 3'; y
- (e) un ácido nucleico que codifica una secuencia de reconocimiento de la replicación del 3' alfavirus.
- 35 24. El ácido nucleico replicón recombinante de la reivindicación 23, en donde el primero y segundo casetes promotor subgenómico de alfavirus-IRES-NOI heterólogo comprende además una secuencia de ácido nucleico no codificante espaciadora situada 3' al promotor subgenómico de alfavirus y 5' al IRES
- 40 25. El ácido nucleico replicón recombinante de la reivindicación 23 o 24, que comprende además una señal de empaquetamiento de alfavirus.
26. Una población de partículas de alfavirus infecciosas, defectuosas, en donde cada partícula comprende el ácido nucleico replicón recombinante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 45 27. Una población de partículas de alfavirus infecciosas, defectuosas de acuerdo con la reivindicación 26, en donde la población no tiene virus competente de replicación detectable, como se midió por el paso en cultivo celular.
- 50 28. Una composición farmacéutica que comprende la población de la reivindicación 26 o 27 en un portador farmacéuticamente aceptable.
29. Una partícula de alfavirus que comprende un ácido nucleico replicón recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25.
- 55 30. La partícula de alfavirus de la reivindicación 29, que comprende una mutación de atenuación.
31. Un ácido nucleico recombinante que comprende:
- 60 (a) una secuencia de reconocimiento de la replicación del 5' alfavirus;
- (b) un casete promotor subgenómico de alfavirus- IRES-NOI heterólogo, que está en la orientación 5' a 3', en donde el NOI codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus; y
- (c) una secuencia de reconocimiento de la replicación del 3' alfavirus.

32. El ácido nucleico recombinante de la reivindicación 31, en donde los casetes promotor subgenómico de alfavirus-IRES-NOI heterólogo comprenden además una secuencia de ácido nucleico no codificante espaciadora situada 3' respecto al promotor subgenómico de alfavirus y 5' al IRES.
- 5 33. Una célula que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 31 o 32.
34. El ácido nucleico de la reivindicación 1 o reivindicación 2, que además comprende una señal de empaquetamiento del alfavirus.
- 10 35. Un método in vitro para preparar partículas de alfavirus defectuosas infecciosas, que comprende :
- a) introducir en una célula lo siguiente:
- 15 (i) un ácido nucleico replicón recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, y
(ii) uno o más ácidos nucleicos cooperadores que codifican las proteínas estructurales de alfavirus, en donde uno o más ácidos nucleicos cooperadores producen todas las proteínas estructurales de alfavirus; y
- 20 b) producir dichas partículas de alfavirus en la célula.
36. El método de la reivindicación 35, en donde el ácido nucleico replicón recombinante adicional comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural de alfavirus.
- 25 37. El método de la reivindicación 35, en donde el ácido nucleico cooperador es un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de reconocimiento de replicación del 5' alfavirus, un promotor subgenómico de alfavirus, un ácido nucleico que codifica una proteína estructural del alfavirus y una secuencia de reconocimiento de replicación del 3' alfavirus.
- 30 38. El método de la reivindicación 35, en donde el ácido nucleico cooperador es un ácido nucleico recombinante que comprende un promotor y secuencias de nucleótidos que codifican una o más proteínas estructurales de alfavirus.
39. El método de la reivindicación 38, en donde el ácido nucleico cooperador es ADN.
- 35 40. El método de la reivindicación 38, en donde el promotor es un promotor CMV.
41. El método de la reivindicación 38, en donde el ácido nucleico cooperador comprende las secuencias de nucleótidos que codifican todas las proteínas estructurales de alfavirus.
- 40 42. El método de la reivindicación 35, en donde el ácido nucleico cooperador es un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de reconocimiento de replicación del 5' alfavirus, un elemento IRES, un ácido nucleico que codifica una proteína estructural del alfavirus y una secuencia de reconocimiento de replicación del 3' alfavirus.
- 45 43. Un método in vitro para preparar partículas de alfavirus defectuosas, infecciosas, que comprende:
- a) introducir en una célula lo siguiente:
- 50 i) un ARN replicón de alfavirus que comprende una secuencia de reconocimiento de replicación del 5' alfavirus, secuencia(s) de ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) proteínas no estructurales de alfavirus, un promotor subgenómico de alfavirus, una secuencia de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de reconocimiento de replicación del 3' alfavirus; y
ii) uno o más ácidos nucleicos cooperadores que codifican proteínas estructurales de alfavirus que comprenden un ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 31 o 32, en el que todas las proteínas estructurales de alfavirus se producen en la célula; y
- 55 b) producir dichas partículas de alfavirus en la célula.
- 60 44. Un método in vitro para preparar partículas de alfavirus defectuosas, infecciosas que comprende:
- a) introducir en una célula lo siguiente:
- i) un ácido nucleico replicón recombinante de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2; y

ii) uno o más ácidos nucleicos cooperadores que codifican proteínas estructurales de alfavirus que comprenden un ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 31 o 32, en el que todas las proteínas estructurales de alfavirus se producen en la célula; y

5 b) producir dichas partículas de alfavirus en la célula.

45. La población de la reivindicación 26 o 27 o la composición farmacéutica de la reivindicación 28 para el uso al inducir una respuesta inmune en un sujeto.

10 46. Una partícula de alfavirus defectuosa infecciosa producida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 35 a 42 o 44.

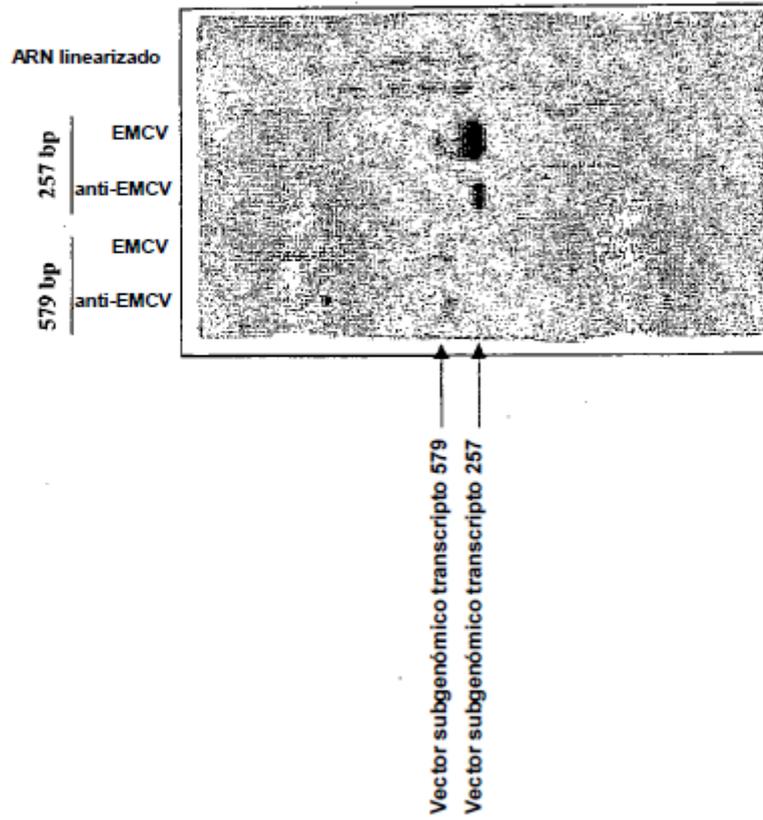


Figura 1. Análisis Northern del replicón espaciador-IRES de ARN subgenómicos