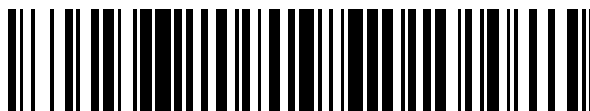


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 517 869**

51 Int. Cl.:

A61K 39/39 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2007 E 07842383 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 2061508**

54 Título: **Partículas de replicones de alfavirus emparejadas con antígenos proteicos como adyuvantes inmunológicos**

30 Prioridad:

12.09.2006 US 825395 P

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

04.11.2014

73 Titular/es:

**ALPHAVAX, INC. (100.0%)
P.O. Box 110307, 2 Triangle Drive
Research Triangle Park, NC 27709-0307 , US**

72 Inventor/es:

**SMITH, JONATHAN F.;
HUBBY, BOLYN y
COPP, LAURA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 517 869 T3

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

DESCRIPCIÓN

Partículas de replicones de alfavirus emparejadas con antígenos proteicos como adyuvantes inmunológicos

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a tecnología de ADN recombinante, y en particular a la introducción de ácido(s) nucleico(s) extraños en una célula eucariota, y más en particular a métodos para producir composiciones inmunógenas que comprenden partículas de virus infecciosas o partículas de tipo virus, con altos rendimientos, en especial partículas útiles en inmunoterapias, vacunas y/o composiciones inmunógenas. En particular, la presente solicitud describe preparaciones de partículas de replicones de alfavirus (ARP) altamente purificadas, en especial aquellas que expresan un antígeno de interés adecuado para usar en medicina humana y veterinaria y para potenciar la respuesta del sistema inmunitario frente a un antígeno administrado simultáneamente.

10 El género alfavirus incluye una variedad de virus, todos los cuales son miembros de la familia Togaviridae. Los alfavirus incluyen el virus de la encefalitis equina oriental (EEE), virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), virus Everglades, virus Mucambo, virus Pixuna, virus de la encefalitis equina occidental (WEE), virus Sindbis, virus del bosque SemLiki, virus Middleburg, virus de Chikungunya, virus O'nyong-nyong, virus de Ross River, virus del bosque Barmah, virus Getah, virus Sagiyama, virus Bebaru, virus Mayaro, virus Una, virus Aura, virus Whataroa, virus Babanki, virus Kyzylgach, virus Highlands J, virus Fort Morgan, virus Ndumu y virus Buggy Creek. El genoma vírico es un ARN mensajero efector monocatenario, modificado en el extremo 5' con un casquete metilado y en el extremo 3' con un tramo de poli(A) de longitud variable. Las subunidades estructurales que contienen una sola proteína vírica, cápside, se asocian con el genoma de ARN en una nucleocápside icosaédrica. En el virión, la cápside está rodeada por una envuelta lipídica cubierta por una matriz regular de espículas de proteínas transmembrana, cada una de las cuales consiste en un complejo heterodímero de dos glucoproteínas, E1 y E2. Véase Pedersen et al., 1974, *J. Virol.* 14:40. Se considera que los virus Sindbis y del bosque de SemLiki son los alfavirus prototípicos, y se han estudiado ampliamente. Véase, Schlessinger, *The Togaviridae and Flaviviridae*, Plenum Publishing Corp., Nueva York (1986). Los virus VEE se han estudiado ampliamente, véase, p. ej., la patente de EE.UU. n° 5.185.440.

15 Los estudios de estos virus han llevado al desarrollo de técnicas para vacunar contra las enfermedades producidas por alfavirus y contra otras enfermedades mediante el uso de vectores de alfavirus para la introducción de genes extraños. Véase la patente de EE.UU. n° 5.185.440, de Davis et al., y la publicación PCT WO 92/10578. El uso de vectores de alfavirus para dirigir la expresión de genes extraños en eucariotas se ha convertido en un tema de interés creciente. Se sabe bien que las vacunas de virus vivos atenuados están entre los medios más eficaces para controlar las enfermedades víricas u otras enfermedades. Sin embargo, para algunos patógenos víricos la inmunización con una cepa vírica viva puede ser poco práctica o no ser segura. Una estrategia alternativa es la inserción de secuencias que codifican antígenos inmunizadores de dichos agentes en una cepa de replicación viva de otro virus. Uno de dichos sistemas que usa un vector de VEE vivo se describe en las patentes de EE.UU. n° 5.505.947 y 5.643.576 de Johnston et al. Otro de dichos sistemas se describe en Hahn et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2679-2683 (1992), en donde construcciones del virus Sindbis expresan una forma truncada de la proteína hemaglutinina del virus influenza. Otro sistema es el sistema de replicones alfavirus, descrito en la patente de EE.UU. n° 6.190.666 de Garoff et al., patentes de EE.UU. n° 5.792.462 y 6.156.558 de Johnston et al., patentes de EE.UU. n° 5.814.482, 5.843.723, 5.789.245, 6.015.694, 6.105.686 y 6.376.236 de Dubensky et al; solicitud publicada de EE.UU. n° 2002-0015945 A1 (Polo et al.), solicitud publicada de EE.UU. n° 2001-0016199 (Johnston et al.), Frolov et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11371-11377 y Pushko et al. (1997) *Virology* 239:389-401.

20 El documento WO 2004/000872 no muestra la administración simultánea de una proteína de interés y partículas de replicones de alfavirus que expresan esa misma proteína de interés, pero esta publicación enseña una mutación en la partícula de alfavirus que se dice que potencia la inmunogenicidad de las propias partículas comparada con la de otras partículas de replicones de virus de VEE atenuados.

25 Pushko et al. (1997) *Virology* 239:389-401 describe la administración de una preparación de partículas de replicones de virus de VEE que expresan un antígeno heterólogo para el VEE, pero no la administración simultánea de este antígeno proteico y las partículas de replicones de virus que expresan este antígeno.

30 Davis et al. (2000) *Virology* 74:371-378 enseña la administración de partículas de replicones de virus que expresan antígenos del virus de inmunodeficiencia simio, pero no la administración simultánea de este antígeno proteico y las partículas de replicones de virus que expresan este antígeno.

35 Goldberg et al. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11A:8114-8121 compara las respuestas inmunitarias logradas por la administración de una vacuna de ADN plasmídico para la tirosinasa o de partículas de replicones de virus vaccinia que expresan la tirosinasa, pero no la administración simultánea de la proteína y cualesquiera partículas de replicones de virus que expresan esta proteína.

40 Siguen siendo necesarios en la técnica métodos que permitan la producción de una respuesta inmunitaria más eficaz a una composición inmunógena administrada, en especial una composición inmunógena que comprende al menos un antígeno proteico y uno o más tipos de partículas de replicones de alfavirus que expresan el o los mismos

antígenos proteicos, en especial una composición que comprende menos antígeno que en una composición de vacuna convencional de dicho antígeno, en especial donde se busca una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica, de modo que haya una enfermedad menos grave, riesgo menor de enfermedad o no haya enfermedad en respuesta al patógeno relevante, cáncer o trastorno metabólico.

5 Breve resumen

Se proporcionan partículas de replicones de alfavirus para usar en la potenciación de la respuesta inmunitaria en un sujeto en el que se coadministra una proteína inmunógena y las partículas de replicones de alfavirus que expresan la proteína inmunógena. Las partículas se administran simultáneamente con la proteína inmunógena, o las partículas y la proteína inmunógena se administran simultáneamente y en el mismo sitio. En estos usos, la vía de administración puede ser subcutánea, intramuscular, intranasal, intravenosa, intraperitoneal o mucosa (genital, nasal, respiratoria, rectal o gastrointestinal). La dosis de partículas de replicones de alfavirus puede ser al menos 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 o 1×10^6 unidades infecciosas (UI) por ml, medido por ensayo en células cultivadas en condiciones permisivas a alfavirus, y refleja el nivel economizador de dosis que se puede conseguir mediante la práctica de los usos y composiciones de esta invención. Alternativamente, se pueden usar dosis más altas para conseguir una potenciación de una respuesta inmunitaria, en especial en enfermedades donde es más difícil elevar la respuesta inmunitaria robusta, p. ej., en el cáncer donde debe romperse la tolerancia al autoantígeno para lograr la respuesta inmunitaria. En dichas situaciones, la dosis de partículas de replicones de alfavirus usada puede ser la misma que la usada en ausencia de la proteína inmunógena. Típicamente, una dosis de partículas de replicones de alfavirus solas que es eficaz es al menos 1×10^6 , y puede estar en el intervalo de 1×10^7 , 1×10^8 , y 1×10^9 , UI por ml.

En los usos descritos en la presente memoria, las partículas de replicones de alfavirus se obtienen del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), y preferiblemente se obtienen de una cepa atenuada del VEE, p. ej., TC-83 (véase, Smith et al, publicación de patente de EE.UU. n° 2005-0266550).

La presente solicitud describe un método economizador de dosis de una proteína inmunógena necesaria para proporcionar inmunización eficaz de un sujeto, que comprende coadministrar partículas de replicones de alfavirus capaces de expresar la proteína inmunógena junto con la proteína inmunógena. La dosis de las partículas de replicones de alfavirus preferiblemente es al menos 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 o 1×10^6 unidades infecciosas (UI) por ml, medido por ensayo en células cultivadas en condiciones permisivas a alfavirus. En estos métodos, la dosis de la proteína inmunógena usada es al menos dos veces, tres o cinco o diez veces menor que la dosis de dicha proteína inmunógena necesaria para proporcionar inmunización eficaz sola (es decir, sin una preparación de ARP para expresar la misma proteína o similar). En algunas realizaciones, la dosis de la proteína inmunógena usada es al menos 50 o 100 veces menor que la dosis de dicha proteína inmunógena necesaria para proporcionar inmunización efectiva sola.

En otro aspecto, se describe una composición economizadora de refuerzos, en donde el número de dosis de una vacuna o composición inmunoterapéutica necesario para proporcionar la inmunización eficaz de un sujeto, se reduce administrando partículas de replicones de alfavirus capaces de expresar la proteína inmunógena junto con la proteína inmunógena.

La presente solicitud también proporciona composiciones de vacunas que comprenden (a) proteína purificada y (b) partículas de replicones de alfavirus capaces de expresar la proteína. El alfavirus a partir del cual se obtienen las partículas de replicones de alfavirus es el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), y dichas partículas se pueden denominar en la presente memoria "VRP". Las composiciones pueden comprender además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En los usos y composiciones proporcionados en la presente memoria, la proteína inmunógena puede ser al menos una proteína inmunógena del virus influenza, en especial una proteína hemaglutinina, u otra proteína frente a la que un ser humano produce una respuesta inmunitaria protectora después de la administración de una composición inmunógena que comprende la misma. La proteína inmunógena puede ser una proteína de longitud completa o un fragmento inmunógeno o epítipo del mismo. Se prefieren en particular para las composiciones inmunógenas derivadas de influenza, las que comprenden más de un tipo antigénico, tal como las preparaciones de vacuna contra influenza trivalentes o cócteles mezcla de proteína producida de forma recombinante. Otras proteínas inmunógenas se pueden obtener de otros patógenos víricos tales como sarampión, paperas, rubéola, sarampión, vaccinia, virus del herpes, entre otros. Para la profilaxis para enfermedades bacterianas, la proteína inmunógena puede ser toxinas de ántrax (atenuadas) y antígenos de *Bacillus anthracis*, antígenos de *Yersinia pestis*, toxina diftérica inactiva de *Corynebacterium diphtheriae*, toxina inactiva de *Clostridium botulinum*, especies de *Chlamydia*, *Mycobacterium tuberculosis*, y un hospedante de otros conocidos en la técnica. Proteína, glicoproteína, lipoproteína, toxina, toxina atenuada, toxina inactivada, virus, antígenos de células cancerosas, proteínas bacterianas o parte(s) de las mismas, toxinas inactivadas u otras proteínas bacterianas, proteínas fúngicas o parte(s) de las mismas, hongos atenuados, hongos inactivados, parásitos o proteínas o parte(s) de las mismas, proteínas protozoarias o parte(s) de las mismas y el producto de expresión de un minigén que codifica una serie de epítopos de interés, por ejemplo, de diferentes serotipos del virus influenza, se pueden incorporar todos en los usos y composiciones. Además, se pueden incorporar antígenos de células neoplásicas en las estrategias de vacuna economizadora de dosis para la

inmunización terapéutica o profiláctica. Alternativamente, la proteína inmunógena o polipéptido puede ser cualquier antígeno de célula tumoral o cancerosa. El antígeno tumoral o canceroso puede ser uno expresado en la superficie de la célula cancerosa. Los antígenos cancerosos de ejemplo para cánceres de mama específicos son los antígenos HER2 y BRCA1. Otros antígenos de célula cancerosa y tumoral ilustrativos se describen en S.A. Rosenberg, (1999) *Immunity* 10:281) e incluyen, pero no se limitan 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, antígeno de tumor de Wilms, tirosinasa, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico (PSA), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), antígeno de citoblastos prostáticos (PSCA), aspartil (asparaginil) β -hidroxilasa humana (HAAH), y EphA2 (una tirosina quinasa de célula epitelial, véase la publicación de patente internacional nº WO 01/12172).

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la potenciación sinérgica de las respuestas humorales tras el cosuministro de vacunas basadas en VRP y proteína emparejadas. Se inmunizaron grupos de 6 ratones Balb/c por vía intraperitoneal con 15 μ g de proteína HA expresada por baculovirus, 1×10^7 UI de HA VRP, o los dos combinados, y se administró refuerzo 3 semanas después de la sensibilización. Los títulos de anticuerpos se midieron como títulos recíprocos de ELISA y se indican en la figura: figura 1A: títulos 3 semanas después de sensibilización, justo antes de la inoculación de refuerzo; figura 1B: títulos medidos 1 semana después de sensibilización. Se muestran los títulos medios geométricos como la barra horizontal.

La figura 2 muestra la potenciación sinérgica de las respuestas humorales tras el cosuministro de una dosis baja de vacunas basadas en VRP y proteína emparejadas. Se inmunizaron grupos de 6 ratones Balb/c por vía subcutánea con 100 ng de proteína HA, 1×10^7 UI de HA VRP, o los dos combinados, y se administró refuerzo 3 semanas después de la sensibilización. Los títulos de anticuerpos se midieron como títulos recíprocos de ELISA y se indican en la figura: figura 2A: títulos 3 semanas después de sensibilización, justo antes de la inoculación de refuerzo; figura 2B: títulos medidos 1 semana después de sensibilización. Se muestran los títulos medios geométricos como la barra horizontal. "Wy HA" es la HA H3 de la cepa de influenza de Wyoming; "Viet VRP" son las VRP que expresan el gen de HA H5 de la cepa de Vietnam de influenza aviar. VRP "vacía" son VRP que no codifican un antígeno.

La figura 3 muestra la cinética de la respuesta humoral después de una sola dosis de las preparaciones de vacuna indicadas. Se inmunizaron siete (7) ratones por grupo por vía subcutánea con una sola dosis de la preparación de vacuna/dosis indicada. Las respuestas humorales se midieron por un ensayo ELISA usando la proteína H3 Wyoming, que tiene reacción cruzada con la proteína HA/Wisconsin. Las diferencias entre los datos de medición "Wisconsin HA VRP + TIV (100 ng)" a las 4 y 6 semanas después de inmunización y las otras inmunizaciones son estadísticamente significativas.

La figura 4 muestra la cinética de la respuesta humoral después de una sola dosis de las preparaciones de vacuna indicadas. Se inmunizaron siete (7) ratones por grupo por vía intramuscular con una sola dosis de la preparación de vacuna/dosis indicada. Las respuestas humorales se midieron por un ensayo ELISA usando la proteína H3 Wyoming, que tiene reacción cruzada con la proteína HA/Wisconsin. Las diferencias entre los datos de medición "Wisconsin HA VRP + TIV (100 ng)" a las 4 y 6 semanas después de inmunización y las otras inmunizaciones son estadísticamente significativas.

La figura 5 muestra los resultados de un estudio en el que la vacunación con VRP/antígeno emparejados se potenció más por la coadministración de VRP que expresan la citoquina IL-12. Se inmunizaron ratones por vía intramuscular con una sola dosis de la preparación de vacuna/dosis indicada, y las respuestas humorales se midieron como en la figura 4.

Descripción detallada

Se necesitan en la técnica adyuvantes de vacunas económicos, potentes, que economicen dosis o que economicen refuerzos, en especial con respecto a las vacunas para el cáncer, toxina e influenza, así como vacunas para otras enfermedades. La presente solicitud proporciona un sistema de vector replicón de ARN, derivado de un alfavirus que preferiblemente está atenuado, para producir adyuvantes de partículas de replicones de tipo alfavirus (ARP) con propagación defectuosa, de un solo ciclo que contienen ARN autorreplicante (replicón) que expresa un antígeno de interés para administrar junto con el mismo antígeno en un vehículo farmacéuticamente aceptable, y potencialmente con un adyuvante inmunológico, o una partícula de replicón de alfavirus que expresa una proteína inmunoestimuladora, por ejemplo, la interleuquina-12 (IL-12). Cuando se inoculan en animales, estos adyuvantes de ARP potencian significativamente las respuestas inmunitarias humoral y celular frente a materiales inmunógenos, tales como vacunas basadas en subunidades, proteínas u otros antígenos de interés. Es particularmente importante generar una respuesta rápida y fuerte frente a un patógeno, por ejemplo, un virus influenza estacional o pandémico.

Un beneficio de los presentes usos y composiciones es que son, al menos en parte, "economizadores de dosis", que significa que la cantidad de material en una dosis dada se puede reducir y conseguir todavía la inmunización eficaz, o como "economizadores de refuerzos", que significa que se puede reducir el número de inyecciones o inoculaciones necesarias para conseguir la inmunización eficaz o la respuesta inmunitaria. Como un ejemplo,

muchas vacunas requieren 3 inyecciones, separadas a lo largo de 6 a 12 meses. Las composiciones reivindicadas en la presente memoria pueden reducir el número de inyecciones a 2, o en el caso de una sola vacunación de refuerzo tal como la vacuna de refuerzo para influenza anual, a una inyección. Alternativamente, las presentes composiciones se pueden usar con dosis más altas con regímenes de sensibilización-refuerzo regulares para proporcionar una inmunización más robusta (respuesta inmunitaria).

Los presentes usos y composiciones se refieren a una combinación de un antígeno proteico y una ARP que expresa el antígeno proteico, es decir, componentes “emparejados” (el mismo). Se prevé que el “emparejamiento” puede ser exacto, o que pueden ser antígenos estrechamente relacionados. Por ejemplo, el serotipo H3 de la proteína hemaglutinina del virus influenza tiene muchas variantes, tales como las variantes de Wyoming y Wisconsin, que comparten varios epítomos. Una realización es una composición que comprende la proteína HA H3 de Wyoming combinada con ARP que expresan la proteína HA H3 de Wyoming, y una segunda realización comprende la proteína HA H3 de Wisconsin combinada con ARP que expresan la proteína HA H3 de Wyoming. La composición inmunógena administrada a un sujeto comprende el o los antígenos proteicos de interés, así como las ARP que expresan el o los mismos antígenos, es decir emparejados. Alternativamente, se pueden administrar composiciones separadas que comprenden el antígeno y las ARP para conseguir el mismo resultado beneficioso.

El antígeno proteico puede ser al menos una proteína extraída de un microorganismo, virus, parásito, o tumor o célula tumoral, o una proteína producida de forma recombinante en sistemas de expresión eucariotas o procariotas. En realizaciones preferidas, la proteína se presenta en alguna o toda su conformación natural intacta para asegurar la obtención de anticuerpos neutralizantes frente a la proteína. El antígeno proteico puede ser uno o más epítomos que se han sintetizado, purificado a partir de digestiones de proteínas, o producido de forma recombinante en un sistema de expresión que permite la presentación de múltiples epítomos, p. ej., un “minigen”.

Un aspecto específico de los presentes usos y composiciones es la magnitud de la potenciación de las respuestas humorales, o de anticuerpos, cuando se coadministran ARP que expresan un antígeno con una preparación de proteínas de un antígeno “emparejado” (el mismo). La magnitud puede ser alguna desde 2 veces a más de 100 veces; es típica la potenciación de 5 veces y 10 veces. Dicha potenciación es sorprendente, dada la naturaleza transitoria de la expresión y el funcionamiento localizado de las ARP, y es útil para mejorar la eficacia de la vacuna y proporcionar niveles altos de anticuerpos para recoger para usar en investigación, diagnóstico y aplicaciones terapéuticas.

En el presente contexto, las ARP que expresan el antígeno proteico de interés, se pueden ver como que sirven como ARP adyuvantes para el antígeno proteico, aunque está bien establecido que las ARP que expresan antígeno pueden inducir una respuesta inmunitaria cuando se administran solas a un sujeto. Las ARP adyuvantes se ensayan en un modelo de primate no humano. Además de la optimización, estos estudios incluyen el seguimiento de la toxicidad y la caracterización de los efectos economizadores de dosis debido a los adyuvantes de VRP. Para este propósito, se pueden usar vacunas de influenza existentes tales como la vacuna contra influenza trivalente (TIV) o una de H5N1 de Indonesia inactivada, H5N1 de Vietnam u otra cepa de influenza, y se miden las respuestas inmunitarias funcionales a las cepas de influenza A u otras cepas relevantes.

La gripe se extiende rápidamente por todo el mundo en epidemias estacionales, matando potencialmente a millones de personas en años pandémicos y cientos de miles en años no pandémicos. Crea costes sanitarios con 200.000 hospitalizaciones solo en EE.UU. y costes adicionales asociados con la pérdida de productividad. El siglo XX vio tres pandemias de gripe cada una después de un cambio antigénico en el gen de la hemaglutinina (HA), que mataron millones de personas (no limitadas a ancianos) en todo el mundo. La principal amenaza de pandemia de gripe actual en el mundo es H5, para la cual no hay inmunidad actual en la población.

La vacunación sigue siendo el método más eficaz y económico para proteger al público contra la gripe. Aunque se han explorado nuevos planteamientos, se siguen usando las vacunas producidas usando el tradicional virus influenza muerto desarrollado en huevo. No obstante, hay defectos graves en la tecnología, incluyendo la dependencia de los huevos, antigenicidad impredecible y por lo tanto requisito de dosis, riesgo de producir vacunas contra un tipo equivocado de virus influenza, y riesgos de cantidades insuficientes de dosis de vacuna para proteger al público, requiriendo una gran prioridad para funcionarios sanitarios. Para ilustrar la necesidad de mejoras, 5-20% de los americanos contraen gripe cada año, produciendo una media de 36.000 muertes durante la década de 1990 a pesar de los esfuerzos de vacunación anuales. Según los CDC 218,1 millones de personas en EE.UU. estarán incluidos en los grupos objetivo recomendados para la vacunación, incluyendo 91,2 millones con un estado de alto riesgo. La cobertura para la gripe autodeclarada supervisada por la encuesta nacional de entrevista de salud de EE.UU. (NHIS) muestra un aumento pequeño a lo largo de los últimos 10 años y que es tan bajo como 24% y 46% para personas con un estado de riesgo alto en los grupos de edad de 18-49 y 50-65, respectivamente, y solo 40% entre los trabajadores sanitarios. Una mayor cobertura de la vacuna requeriría la fabricación de números de dosis varias veces superiores a la capacidad actual de suministro. Esta situación es incluso más urgente por una potencial gripe pandémica donde la proyección es que se requerirá una dosis más fuerte o dosis múltiples, dado que se administran a personas que no han recibido tratamiento inmunológico previo, lo cual no es normalmente el caso para las vacunaciones contra influenza estacionales. Se aplican consideraciones similares para proteger contra otros agentes infecciosos y potenciales agentes bioterroristas y guerra biológica.

El objetivo de conseguir una protección para una amplia población contra la gripe tanto estacional como pandémica, se beneficiaría significativamente de una tecnología que pudiera reducir la cantidad de antígeno por dosis, el número de inoculaciones requeridas (en especial, en el caso de una vacuna contra influenza pandémica), y/o si las vacunas actuales se pudieran elevar para inducir una respuesta inmunitaria más amplia. Aunque las respuestas celulares (CTL) pueden tener uso limitado para la protección contra la propia infección, en la bibliografía se sugiere que las respuestas CTL pueden tener una función significativa en la eliminación de la infección por influenza y en la protección frente a la mortalidad por influenza. Se aplican consideraciones similares a otros riesgos para la salud, incluyendo, pero no limitado a los asociados con bacterias, virus, hongos y otros patógenos y parásitos, así como cánceres. Los antígenos proteicos se pueden producir de forma recombinante para usar en composiciones inmunógenas junto con las ARP que expresan los mismos antígenos; la administración de dichas composiciones proporciona una respuesta inmunitaria superior a la obtenida con las composiciones inmunógenas convencionales, con reducción de la cantidad de proteína necesaria, directa o indirectamente por la necesidad de menos administraciones por persona (o animal) en la que se busca la respuesta inmunitaria.

Datos recientes indican que tanto las respuestas humorales como celulares frente a un antígeno diana se pueden potenciar por coinmunización con ARP que expresan moléculas inmunoestimuladoras (IS), por ejemplo la interleuquina-12. La conexión de esta estrategia con la estrategia de antígeno/ARP emparejados, podría conducir a oportunidades adicionales de economizar dosis y/o economizar refuerzos, siempre que se puedan generar respuestas inmunitarias equivalentes con dosis significativamente menores o un número menor de inoculaciones para la vacunación eficaz. Esta estrategia puede encontrar aplicación particular en la inmunoterapia para el cáncer, donde se espera que sean necesarias múltiples vacunaciones para conseguir la respuesta óptima en el sujeto. Estos usos y composiciones presentes deben minimizar el número de tratamientos que un sujeto necesitará para conseguir el efecto óptimo.

Los autores de la invención han demostrado que la vacunación con una combinación de VRP que expresan la HA A/Wyoming y la proteína HA A/Wyoming recombinante, produce respuestas de anticuerpos anti-HA que son significativamente mayores que las respuestas conseguidas con las VRP o la proteína recombinante sola (figuras 1 y 2). Una sola inyección de la vacuna combinada inducía este potente efecto sinérgico que se consiguió usando solo 100 ng de proteína recombinante. El potencial economizador de dosis de este planteamiento de vacuna en las vacunas contra influenza estacional y pandémica, se evalúa en ratones. Se entiende que esta misma estrategia de emparejamiento de proteína antígeno de interés y proteína antígeno expresada por una preparación de partículas de replicones de alfavirus administrada simultáneamente que expresa el mismo antígeno, se puede aplicar a otros antígenos proteicos además de la hemaglutinina del virus influenza ilustrada específicamente. Otras aplicaciones incluyen, sin limitación, antígenos proteicos de tejidos tumorales y/o células cancerosas, patógenos y parásitos, incluyendo bacterias que incluyen, pero no se limitan a *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonellae*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Streptococcus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Staphylococcus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, especies de *Chlamydia*, *Mycobacterium tuberculosis*, hongos que incluyen, pero no se limitan a *Candida*, *Aspergillus*, protozoos que incluyen, pero no se limitan a *Giardia*, *Amoebae*, tripanosomas, *Plasmodium falciparum* y otros, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium*, *Cryptococcus*, y otros tales como toxinas de plantas, animales, dinoflagelados, de algas o bacterianas. Alternativamente, la proteína o polipéptido inmunógeno puede ser cualquier antígeno de célula tumoral o cancerosa. El antígeno de tumor o cáncer puede ser uno expresado en la superficie de la célula cancerosa. Los antígenos de cáncer de ejemplo para cánceres de mama específicos son los antígenos HER2 y BRCA1. Se describen otros antígenos de células cancerosas y tumorales ilustrativos en S.A. Rosenberg, (1999) *Immunity* 10:281) e incluyen pero no se limitan 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, antígeno de tumor de Wilms, tirosinasa, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico (PSA), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), antígeno de citoblastos prostáticos (PSCA), aspartil (asparaginil) β -hidroxilasa humana (HAAH), y EphA2 (una tirosina quinasa de célula epitelial, véase la publicación de patente internacional n° WO 01/12172).

Se ha observado previamente que las ARP tienen la capacidad de activar rutas inmunitarias innatas independientemente de los transgenes expresados. Usando ratones que no expresan IFN α/β , se mostró que la potencia para producir respuestas de linfocitos T dependía de la señalización de IFN de tipo I. Otro grupo mostró que el IFN de tipo I no era necesario para potenciar las respuestas humorales. La coadministración de proteína recombinante junto con ARP que expresan un transgén irrelevante, o ARP que no expresan transgenes en absoluto ("VRP vacío", véase Thompson et al. 2006. *PNAS* 103:3722-3727) daba como resultado respuestas humorales más fuertes contra la proteína recombinante presente en el inóculo. Además, también se potenciaban las respuestas humorales mucosas. Aunque el IFN de tipo I no es necesario para la potencia de las ARP que expresan antígeno, estos investigadores demostraron que esta ruta de señalización era necesaria para la capacidad de las VRP vacías para potenciar las respuestas humorales. Es interesante, que no se encontró que las respuestas celulares fueran potenciadas por la coadministración de las ARP vacías.

Combinación de ARP con inmunógenos proteicos

Los procedimientos usados para hacer las VRP usadas en estos estudios se basan en un sistema de dos sistemas auxiliares, como se describe con detalle en la patente de EE.UU. n° 7.078.218. Brevemente, los ARN replicones con

casquete se transcribieron in vitro usando un kit T7 RiboMax (Promega, Madison WI) siguiendo las instrucciones del fabricante, complementado con análogo de CAP 7,5 mM CAP (Promega), a partir de un plásmido replicón linearizado que codifica el antígeno (p. ej., HA) expresado a partir de un casete regulador que contiene un promotor 26S de alfavirus, un espaciador (383 nucleótidos) y el IRES EV71. Esta construcción la describen con detalle Kamrud et al. en *Virology* 360(2):376-387, 10 April 2007). Los plásmidos auxiliares sin casquete para la cápside y glicoproteína se transcribieron in vitro de forma similar. Después, estos ARN se purificaron usando columnas de purificación RNEasy (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Células Vero (1×10^8 células) suspendidas en PBS se combinaron con 30 μ g de ARN replicón, 30 μ g de ARN auxiliar y 60 μ g de ARN auxiliar de glicoproteína en cubetas de electroporación de 0,4 cm y se electroporaron usando un BIO-RAD Gene Pulser (BIO-RAD). Las células y el ARN se pulsaron 4 veces con el electroporador ajustado a 580 V y 25 μ F. Las suspensiones celulares electroporadas se sembraron en botellas giratorias individuales que contenían 150 ml de medio OptiPro (Invitrogen) complementado con antibióticos, y se incubaron a 37°C en 5% de CO₂ durante 16-24 h. Las VRP se recogieron y almacenaron en partes alícuotas a -80°C. Los títulos de las VRP se determinaron por ensayo de inmunofluorescencia (IFA) usando antisuero policlonal de cabra específico anti-VEE nsP2 como el anticuerpo primario y anticuerpo de burro anti-Alexa Fluor 488 de cabra (Invitrogen, Carlsbad, CA) como el anticuerpo secundario en células fijadas con metanol usando un microscopio de fluorescencia Eclipse TE300 de Nikon.

Se inmunizaron ratones por vía intraperitoneal con (a) proteína hemaglutinina (HA) A/Wyoming de influenza recombinante, (b) VRP que expresan la misma HA, o (c) con un cóctel que consistía tanto en la proteína HA como las VRP que expresan la HA emparejada. Sorprendentemente, la titulación por ELISA de los niveles de Ig específica de HA (figura 2) indicaba que la mezcla de las dos composiciones de vacuna tenía un efecto sinérgico. De hecho, una sola inmunización con la vacuna combinada producía respuestas humorales más fuertes que dos dosis de los componentes individuales.

Se observaron respuestas humorales sinérgicas similares cuando los ratones se inmunizaron por vía subcutánea con una dosis menor (100 ng) de HA Wyoming/influenza recombinante en combinación con HA VRP emparejada (figura 3). Los resultados demuestran que se puede usar incluso una dosis mucho menor (100 ng en lugar de 15 μ g) para producir respuestas muy fuertes si se coadministra con HA VRP. Sin embargo, las proteínas tenían que estar emparejadas, ya que las VRP que expresan HA de influenza A/Vietnam (que es del serotipo H5 en contraposición a H3) no consiguió producir títulos de anticuerpos específicos de HA Wyoming en los mismos niveles elevados que cuando se usaron antígenos emparejados. De hecho, las VRP no emparejadas solo tenían la misma actividad adyuvante que las VRP vacías, lo cual es mucho más débil que la vacuna emparejada.

Evaluación del potencial economizador de refuerzos de las vacunas de HA VRP en combinación con diferentes dosis de vacunas influenza inactivadas

Para el propósito de estudiar el planteamiento de vacuna de proteína/VRP emparejadas usando una cepa relevante para la vacuna de la gripe estacional actual, se clonó el gen de HA de A/Wisconsin/67/2005 en el vector replicón de VEE. Se evaluó la actividad economizadora de refuerzos de 5×10^6 UI de esta VRP (HA_{Wis} VRP) con una dosis baja de vacuna contra influenza trivalente (TIV) en ratones BALB/c. Los ratones se inmunizaron una vez por vía subcutánea o intramuscular y se determinaron las respuestas humorales durante 6 semanas después de inmunización (títulos de HI, usando un ensayo basado en virus influenza/Wisconsin desarrollado en células MDCK). También se determinaron los títulos por ELISA usando HA recombinante como antígeno, y también se siguieron las respuestas más allá de 6 semanas. El uso de una sola inmunización imita cómo se administraría típicamente una vacuna contra influenza estacional, y el seguimiento de la respuesta en tiempos de medición más prolongados después de la inmunización única refleja la necesidad de mantener títulos de anticuerpos a los largo de toda la estación de exposición a influenza.

En el caso de la TIV, que consiste en múltiples proteínas, se pueden analizar los niveles en los sueros de anticuerpos específicos contra no solo la HA emparejada sino contra los otros dos componentes HA_{New Caledonia/20/99} y HA_{B/Malasia/2004}. El fin de este último experimento de titulación es determinar si la HA_{Wisconsin} VRP tiene función inmunomoduladora positiva o negativa en las otras proteínas del inóculo.

Para demostrar que el efecto sinérgico en la inmunogenicidad de las vacunas de proteína/VRP emparejadas se extiende a cepas de influenza potencialmente pandémicas, se lleva a cabo un estudio de inmunogenicidad murino con VRP que expresan el gen de HA H5 de A/Indonesia/5/05 en combinación con la vacuna inactivada correspondiente o con la proteína A/Indonesia/5/05 recombinante disponible en Protein Sciences, Inc. (Meriden, CT). Se estudian diferentes dosis de vacuna inactivada o proteína recombinante (p. ej. 1, 3, 10, 30, 100, 300, o 1000 ng) en combinación con diferentes dosis de VRP que expresan HA H5 (p. ej. 5×10^6 , 1×10^7). El gen de HA A/Indonesia/5/05 se clonó en el replicón basado en VEE para generar las VRP. El virus reordenado A/Indonesia/5/05 6:2 con 6 genes internos de PR8 y HA/NA procedentes de A/Indonesia/5/05, denominado Ind05/PR8-RG2 de forma abreviada, se usa para desarrollar un ensayo de HI interno.

Determinación de las dosis óptimas de HA VRP emparejados para generar efectos sinérgicos en la respuesta inmunitaria frente a diferentes dosis de vacunas contra influenza inactivadas.

Para determinar la dosis óptima de HA VRP emparejados para generar efectos inmunitarios sinérgicos, se

5 ensayaron diferentes dosis de vacuna inactivada (TIV) en combinación con un intervalo de dosis de HA VRP emparejados, como se señala más adelante. En un experimento, se vacunaron ratones BALB/c con combinaciones específicas mostradas en la figura 5. Las respuestas inmunitarias se siguieron como se ha descrito antes. Se hizo el seguimiento de las respuestas inmunitarias humorales como se ha descrito antes. Los resultados muestran que en un intervalo de dosis bajas de TIV (1, 10 y 100 ng), la respuesta inmunógena se potencia con la adición de 1e5 HA VRP emparejados frente a la respuesta de TIV o HA VRP solos.

Generación de construcciones de replicones de alfavirus que contienen el gen de HA A/Wyoming/3/2003 (Wy HA)

El gen de HA de A/Wyoming/3/2003 se amplificó por rtPCR del ARN vírico de A/Wyoming y se clonó en replicones con IRES y sin IRES usando los cebadores descritos a continuación.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador	Utilidad
Panama HA fp pacl	<u>CCTTAATTA</u> AAATGAAGACTATCATTGC (SEQ ID NO:1)	Estos cebadores se usaron para amplificar por PCR y clonar mL-12 en dos replicones que no contienen IRES, pERK y pERK-3 usando EcoRV y sitios de restricción Ascl
Panama HA rp ascl	TTGGCGCGCCTCAAATGCAAATGTTG (SEQ ID NO:2)	
Panama HA FP Xba	CGTCTAGAATGAAGACTATCATTGC (SEQ ID NO:3)	
wyomingHArevxba	TAA AATCTAGATTAATGCAAATGTTGCACC (SEQ ID NO:4)	
Los sitios de restricción están subrayados		

10

Secuencia codificante de A/Wyoming/3/2003 (SEQ ID NO: 5) generada a partir de ARN vírico por rtPCR

atgaagactatcattgctttaagctacattctatgcctggtttctctcaaaagcttccggaaatgacaacagcacggca
 acgctgtgccttggcaccatgcagtaccaaacggaacgatagtgaaaacaatcacgaatgaccaaattgaagtta
 ctaatgctactgagctggtcagagttcctcaacaggtggaatgctgcacagtcctcatcagatccttgatggagaaaa
 ctgcacactaatagatgctctattgggagaccctcagtgatggcttccaaaataagaaatgggaccttttgtgagc
 gcagcaaagcctacagcaactgttacccttatgatgtgccggattatgctcccttaggtcactagttgcctcatccggc
 aactggagtttaacaatgaaagctcaattgggctggagtcactcagaatggaacaagctctgctgcaaaaggag
 atctaataaaagttcttagtagattgaattggtgacccactaaaatacaaataccagcattgaacgtgactatgcc
 aaacaatgaaaaattgacaaattgacattggggggtcaccacccggttacggacagtgaccaaatacagcctata
 tgctcaagcatcaggaagaatcacagtcctacaaaagaagccaacaaactgtaatcccgaatatcggatataga
 cccagggtaagggatactccagcagaataagcatctattggacaatagtaaaaccgggagacatactttgattaac
 agcacaggaaatctaattgctcctcggggttacttcaaaatacgaagtgggaaaagctcaataatgagatcagatgc
 acccattggcaaatgcaattctgaatgcatcactccaaatggaagcattccaatgacaaaccatttcaaaatgtaa
 caggatcacataggggcctgtcccagatatgtaagcaaaacactctgaaattggcaacagggatgcaaatgtac
 cagagaaacaaactagaggcatattggcgcaatcgcggttcatagaaaatggtgggaggggaatggtggacgg
 ttgtacggttcaggcatcaaaattctgagggcacaggacaagcagcagatctcaaaagcactcaagcagcaatc
 aaccaaatcaatgggaaactgaataggtaatcgggaaaacaaacgagaaattccatcagattgaaaagaattct
 cagaagtagaagggaattcaggacctcgagaaatagttgaggacactaaaatagatctctggtcatacaacgc
 ggagcttctgttgcctggaaaaccaacatacaattgatctaactgactcagaaatgaacaaactgttgaaagacc
 aaagaagcaactgagggaaaatgctgaggatagggcaatggtgttcaaaatataccacaaatgtgacaatgct
 gcatagagtcattcagaaatggaacttatgacctgatgtatacagagatgaagcattaaacaaccggtccagatc
 aaagggttgagctgaagtcaggatacaagattggatcctatggatttcccttgccatatactgttttctgtgtgctt
 gttggggttcatatgtggcctgccaaaaggcaacattagggtcaacattgcattaa

La combinación de dosis óptima de VRP y vacuna contra influenza inactivada emparejadas se puede usar junto con

una estrategia de VRP adyuvante adicional usando VRP que expresan citoquinas.

En ratones, una sola inyección de una combinación de proteína recombinante HA de Wyoming y VRP que expresan HA de Wyoming indujo respuestas inmunitarias fuertes usando solo 100 ng de proteína recombinante y 5×10^5 UI de vacuna de VRP. En cambio, las VRP que expresaban la proteína HA H5 heteróloga no fueron capaces de tener efecto adyuvante en las respuestas específicas para H3. Se llevaron a cabo estudios usando la vacuna TIV y una vacuna de VRP que expresaba el gen de HA de A/Wisconsin, la cepa H3N2 incluida en la vacuna TIV, y los resultados se muestran en la figura 4. Con la dosis de TIV relativamente baja de 100 ng, la adición de VRP que expresan el componente HA H3 de TIV, dio como resultado respuestas humorales sostenidas (medido por ELISA) después de una sola inmunización. Sin querer estar ligados por la teoría, es probable que las titulaciones vistas 1 semana después de inyección consistan probablemente principalmente en IgM de vida corta. También se miden las titulaciones de HI, y las mediciones se hacen en periodos de tiempo más largos después de una sola inyección.

Se observa que se obtienen efectos sinérgicos cuando la proteína HA recombinante realizada es homóloga con el gen de HA expresado por el vector replicón. El grado de homología genética y antigénica necesario para este efecto adyuvante se evalúa mediante inmunización de ratones con VRP que expresan el gen de HA de A/Panama (H3N2), A/Wyoming (H3N2), A/Wisconsin (H3N2), o A/New Caledonia (H1N1), cada uno formulado individualmente con una de las cuatro proteínas recombinantes homólogas en una matriz 4x4. Se miden las titulaciones de ELISA y HI para el seguimiento del efecto adyuvante tanto en la proteína entera como en los epítomos específicos de unión. Se lleva a cabo una evaluación similar en el contexto de la vacuna de TIV y VRP combinados mediante el seguimiento de la extensión de las respuestas adyuvantes a A/Wisconsin homóloga comparado con el componente de vacuna A/New Caledonia heterólogo.

Tabla 1

Optimización de la dosis-actividad de HA VRP emparejados para TIV

Vacuna contra influenza		Adyuvante VRP HA A/Wisconsin (U.I.)					
		0	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
TIV	100 ng	12	12	12	12	12	12
	10 ng	12	12	12	12	12	12
Total de 13 grupos							156

Se inmunizan grupos de 12 ratones BALB/c con 10 ng o 100 ng de TIV combinado con o sin VRP Ha Wisconsin con dosis en aumento de 10^3 a 10^7 . Se analizan las respuestas humorales y celulares después de cada inmunización como se ha descrito antes.

Tabla 2

Evaluación de la homología genética/antigénica necesaria para el efecto del adyuvante HA VRP emparejados

Proteína HA recombinante		Adyuvante Influenza A/HA VRP				
		H3			H1	
		HA VRP A/Panama	HA VRP A/Wyoming	HA VRP A/Wisconsin	HA VRP A/New Caledonia	Sin adyuvante VRP
H3	HA A/Panama	12	12	12	12	12
	HA A/Wyoming	12	12	12	12	12
	HA A/Wisconsin	12	12	12	12	12
H1	HA A/New Caledonia	12	12	12	12	12
Sin proteína		12	12	12	12	12
Total de 25 grupos						300

Se inmunizan grupos de 12 ratones BALB/c con VRP que expresan el gen de HA de A/Panama (H3N2), A/Wyoming (H3N2), A/Wisconsin (H3N2), o A/New Caledonia (H1N1), cada uno formulado individualmente con una de las cuatro proteínas recombinantes homólogas en una matriz 4x4. Como testigos, se da cada una de las HA VRP y proteínas recombinantes HA solas. Se analizan las respuestas humorales y celulares después de cada inmunización como se ha descrito antes.

Los productos 2006-2007 TIV están disponibles (Fluarix, GlaxoSmithKline; Fluzone, Sanofi; y Fluvirin, Chiron). TIV (100, 500 y 1000 ng equivalentes) se mezcla con VRP (p. ej. $1e5$, $1e6$, $5e6$ UI) y se hace el seguimiento de la infectividad de las VRP usando células Vero permisivas.

Se cree que las preparaciones de proteínas recombinantes adquiridas para usar en los experimentos descritos en la presente memoria contienen compuestos adyuvantes convencionales.

En algunas construcciones, se lleva a cabo el control de la expresión de ácidos nucleicos a nivel de traducción, introduciendo un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) corriente abajo del promotor, p. ej., el promotor subgenómico 26S de alfavirus, y corriente arriba de la secuencia codificante, p. ej., para la secuencia heteróloga o una proteína estructural de alfavirus, a traducir. El elemento IRES se coloca de forma que dirige la traducción del

ARNm, de modo que minimiza, limita o previene el inicio de la traducción del ARNm de la estructura de metil-7-guanosina (5')pppN presente en el extremo 5' del ARNm sugenómico (el "casquete"). Estas construcciones dan como resultado que el IRES controla la traducción de una secuencia heteróloga independientemente de la transcripción dirigida por el promotor. Se pueden usar IRES de muchas fuentes diferentes, incluyendo elementos IRES víricos de picornavirus, p. ej., poliovirus (PV) o el enterovirus 71 humano, p. ej. las cepas 7423/MS/87 y BrCr del mismo; de virus de encefalomiocarditis (EMCV); de virus de la enfermedad de la fiebre aftosa (FMDV); de flavivirus, p. ej., virus de la hepatitis C (HCV); de pestivirus, p. ej., virus de la fiebre porcina clásica (CSFV); de retrovirus, p. ej., virus de leucemia murina (MLV); de antirretrovirus, p. ej., virus de inmunodeficiencia simio (SIV); de elementos IRES de ARNm celular tales como aquellos de factores de inicio de la traducción, p. ej., eIF4G o DAP5; de factores de transcripción, p. ej., c-Myc o factor de represión de NF- κ B (NRF); de factores de crecimiento, p. ej., factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) y factor de crecimiento derivado de plaquetas B (PDGF B); de genes homeóticos, p. ej., Antennapedia; proteínas de supervivencia, p. ej., inhibidor de apoptosis ligado al cromosoma X (XIAP) o Apaf-1; de chaperonas, p. ej., proteína BiP de unión a la cadena pesada de inmunoglobulina, virus de plantas, así como cualesquiera otros elementos IRES conocidos ahora o más adelante.

La siguiente discusión y definiciones se proporcionan para mejorar la claridad de la presente descripción para un experto en la técnica pertinente.

En el contexto de la presente solicitud, nm significa nanómetros, ml significa mililitros, VEE significa el virus de la encefalitis equina venezolana, EMC significa virus de la encefalomiocarditis, BHK significa células de riñón de cría de hámster, HA significa el gen de la hemaglutinina, GFP significa gen de la proteína verde fluorescente, FACS significa separador de células activadas por fluorescencia, IRES significa sitio de entrada interno al ribosoma, upf significa unidades formadoras de placa, UI significa unidades infecciosas, y FBS significa suero bovino fetal. La expresión "número de aminoácido (p. ej., Lys, Thr, etc.) de E2" indica el aminoácido designado en el resto designado de la proteína E2, y también se usa para referirse a aminoácidos en restos específicos en las proteínas E3 o E1.

Como se usa en la presente memoria, el término "alfavirus" tiene su significado convencional en la técnica, e incluye las diferentes especies tales como virus VEE, virus del bosque SemLiki (SFV), virus Sindbis, virus de Ross River, virus de la encefalitis equina occidental, virus de la encefalitis equina oriental, virus de Chikungunya, S.A. AR86, virus Everglades, virus Mucambo, virus del bosque Barmah, virus Middleburg, virus O'nyong-nyong, virus Getah, virus Sagiyama, virus Bebaru, virus Mayaro, virus Una, virus Aura, virus Whataroa, virus Babanki, virus Kyzylgach, virus Highlands J, virus Fort Morgan, virus Ndumu y virus Buggy Creek. Los alfavirus preferidos usados en las construcciones y métodos son VEE, SA AR86, Sindbis (p. ej. TR339, véase la patente de EE.UU. n° 6.008.035), y SFV.

Las expresiones "secuencia de reconocimiento de replicación de alfavirus 5'" y "secuencia de reconocimiento de replicación de alfavirus 3'" se refiere a las secuencias encontradas en los alfavirus, o secuencias derivadas de las mismas, que son reconocidas por proteínas replicasa no estructurales de alfavirus y llevan a la replicación del ARN vírico. Estas se denominan a veces como los extremos 5' y 3', o secuencias 5' y 3' de alfavirus. El uso de estos extremos 5' y 3' da como resultado la replicación de la secuencia de ARN codificada entre los dos extremos. La secuencia de reconocimiento de replicación de alfavirus 3' encontrada en el alfavirus típicamente es de aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, que contiene una secuencia de reconocimiento de replicación 3' mínima mejor definida. La secuencia de reconocimiento de replicación 3' mínima, conservada entre los alfavirus, es una secuencia de 19 nucleótidos (Hill et al. 1997. *J. Virology* 71: 2693-2704, 1997). Estas secuencias se pueden modificar por técnicas de biología molecular convencionales para minimizar más el potencial para la recombinación o para introducir sitios de clonación, con la condición de que deben ser reconocidas por la maquinaria de replicación del alfavirus.

La expresión "secuencia de reconocimiento de replicación de alfavirus 5' mínima" se refiere a la secuencia mínima que permite el reconocimiento por proteínas no estructurales del alfavirus, pero que no da como resultado el empaquetamiento/recombinación significativa de moléculas de ARN que contienen la secuencia. El empaquetamiento/recombinación de los auxiliares se puede evaluar por diferentes métodos, p. ej., el método descrito por Lu and Silver. 2001. *J. Virol. Methods* 91(1): 59-65).

Las expresiones "replicón de ARN de alfavirus", "ARN replicón de alfavirus", "replicón de vector de ARN de alfavirus" y "vector de ARN replicón" se usan de forma intercambiable para referirse a una molécula de ARN que expresa genes de proteínas no estructurales de modo que puede dirigir su propia replicación (amplificación) y comprende, como mínimo, secuencias de reconocimiento de replicación de alfavirus 5' y 3' (que pueden ser las secuencias mínimas, como se han definido antes, pero pueden ser alternativamente las regiones enteras de los alfavirus), secuencias codificantes para las proteínas no estructurales de alfavirus, y un tramo de poliadenilación. Además puede contener uno o más elementos para dirigir la expresión, que significa la transcripción y traducción junta y/o separada de una secuencia de ARN heteróloga. También se puede diseñar para expresar proteínas estructurales de alfavirus. Johnston et al., Polo et al. (citado en los antecedentes), Smith et al (publicación de patente internacional WO 2004/085660) y Smith et al. (patente de EE.UU. n° 7.045.335) describen numerosas construcciones para dichos replicones de ARN de alfavirus, y dichas construcciones se incorporan en la presente memoria por referencia. Realizaciones específicas de los replicones de ARN de alfavirus pueden contener una o más mutaciones de

atenuación, siendo una mutación atenuante una eliminación, adición o sustitución de nucleótido, de uno o más nucleótidos, o una mutación que comprende la reorganización o construcción quimérica que da como resultado la pérdida de virulencia en un virus vivo que contiene la mutación comparado con el alfavirus natural adecuado. Los ejemplos de una sustitución de nucleótido de atenuación (que produce un cambio de aminoácido en el replicón) incluyen una mutación en la posición del aminoácido 538 de nsP1, posición del aminoácido 96 de nsP2, o posición del aminoácido 372 de nsP2, en el alfavirus S.A.SR86, y un ejemplo de una mutación atenuante en la región no codificante del ácido nucleico replicón es la sustitución de A o C en el nucleótido 3 en el VEE.

Las expresiones “proteína/proteínas estructurales de alfavirus” se refieren a una o una combinación de las proteínas estructurales codificadas por alfavirus. Estas son producidas por el virus como una poliproteína y se representan en general en la bibliografía como C-E3-E2-6k-E1. E3 y 6k sirven como señales de translocación/transporte de membrana para las dos glicoproteínas E2 y E1. Por lo tanto, el uso del término E1 en la presente memoria se puede referir a E1, E3-E1, 6k-E1, o E3-6k-E1, y el uso del término E2 en la presente memoria se puede referir a E2, E3-E2, 6k-E2, o E3-6k-E2. Las mutaciones de atenuación se pueden introducir en una cualquiera o más de las proteínas estructurales de alfavirus.

Las expresiones “auxiliar(es)” o “construcción(es) auxiliar(es)” se refiere a una molécula de ácido nucleico que es capaz de expresar una o más de las proteínas estructurales de alfavirus. Johnston et al., Polo et al. (citado en los antecedentes), Smith et al (publicación de patente internacional WO 2004/085660) y Smith et al. (patente de EE.UU. n° 7.045.335) describen numerosas construcciones auxiliares útiles para expresar proteínas estructurales de alfavirus en la producción de ARP.

Las expresiones “célula auxiliar” y “célula de empaquetamiento” se usan de forma intercambiable en la presente memoria y se refieren a la célula en la que se producen las partículas de replicones de alfavirus. La célula auxiliar comprende un conjunto de auxiliares que codifican una o más proteínas estructurales de alfavirus. Como se describe en la presente memoria, los auxiliares pueden ser ARN o ADN. La célula puede ser cualquier célula que es permisiva a alfavirus, es decir, células que son capaces de producir partículas de alfavirus tras la introducción de un transcrito de ARN vírico. Las células permisivas a alfavirus incluyen, pero no se limitan a células Vero, de riñón de cría de hámster (BHK), 293, 293T, fibroblastos de embrión de pollo (CEF), y de ovario de hámster chino (CHO). Los ácidos nucleicos que codifican proteínas estructurales de alfavirus pueden estar presentes en la célula auxiliar de forma transitoria o por integración estable en el genoma de la célula auxiliar. El o los ácidos nucleicos que codifican las proteínas estructurales de alfavirus que se usan para producir partículas de alfavirus pueden estar bajo el control de promotores constitutivos y/o inducibles. En una realización, las secuencias que codifican proteínas estructurales de alfavirus se pueden proporcionar en un solo ADN auxiliar (véase la patente de EE.UU. n° 7.045.335). Alternativamente, la función del auxiliar se puede proporcionar mediante dos construcciones auxiliares que comprenden un elemento IRES en el que la traducción de estas secuencias codificantes puede ser controlada por la actividad de un elemento del IRES. En dichas realizaciones, el elemento del IRES puede ser activo en el tipo de célula auxiliar específica y no activo o mínimamente activo en otros tipos de células. En realizaciones particulares, las células auxiliares comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas estructurales de alfavirus en una combinación y/o cantidad suficiente para producir partículas de alfavirus como se describen en la presente memoria, cuando se introduce un ácido nucleico replicón recombinante en la célula en condiciones por las cuales se producen las proteínas estructurales de alfavirus y el ácido nucleico replicón recombinante se empaqueta en partículas de alfavirus.

Las expresiones “partículas de replicones de alfavirus”, “partículas de replicones de virus” o “partículas de alfavirus recombinantes”, usadas de forma intercambiable en la presente memoria, significan un complejo estructural de tipo virión que incorpora un ARN replicón de alfavirus que expresa una o más secuencias de ARN heterólogas. Típicamente, el complejo estructural de tipo virión incluye una o más proteínas estructurales de alfavirus insertadas en una envoltura lipídica que encierra una nucleocápside que a su vez encierra el ARN. La envuelta lipídica típicamente deriva de la membrana plasmática de la célula en la que se producen las partículas. Preferiblemente, el ARN replicón de alfavirus está rodeado por una estructura de nucleocápside compuesta de la proteína de cápside del alfavirus y las glicoproteínas del alfavirus están insertadas en la envuelta lipídica derivada de la célula. Las proteínas estructurales y el ARN replicón pueden proceder del mismo o de diferentes alfavirus. En una realización específica, el ARN replicón y las proteínas estructurales se basan en una cepa de VEE atenuada, p. ej., véase Smith et al., publicación de patente de EE.UU. 2005-0266550. En otra realización específica el ARN replicón procede de VEE y las proteínas estructurales proceden de virus Sindbis (véase, p. ej., Dubensky et al., patente de EE.UU. n° 6.376.236). Las partículas de replicones de alfavirus son infecciosas pero de propagación defectuosa, es decir, el ARN replicón no puede propagarse más allá de la célula hospedante que infectaron inicialmente las partículas, en ausencia de ácido o ácidos nucleicos auxiliares que codifiquen las proteínas estructurales de alfavirus.

Se usa un promotor para dirigir la transcripción del ARN a partir del ADN, es decir, una ARN polimerasa dirigida por ADN, para producir el replicón de alfavirus y ácidos nucleicos auxiliares. En el presente contexto, un promotor es una secuencia de nucleótidos reconocida por una polimerasa y suficiente para producir la transcripción de una secuencia asociada (corriente abajo). En algunas realizaciones, el promotor es constitutivo (véase más adelante). Alternativamente, el promotor puede estar regulado, es decir, que no actúa de forma constitutiva, para producir la transcripción de la secuencia asociada. Si es inducible, hay secuencias presentes que median la regulación de la expresión de modo que la secuencia asociada es transcrita solo cuando (i) una molécula de inductor está presente

en el medio en o sobre el que se cultivan las células, o (ii) las condiciones a las que se exponen las células cambian para ser condiciones inductoras. En el presente contexto, una secuencia reguladora de la transcripción incluye una secuencia promotora y puede además incluir secuencias activas en cis para la expresión regulada de una secuencia asociada en respuesta a señales del entorno.

5 En algunas realizaciones del replicón y los ARN auxiliares, la transcripción y la traducción son controlados por separado por diferentes elementos reguladores. El replicón contiene un promotor que dirige la transcripción; un elemento IRES; y una secuencia codificante (p. ej., para una proteína inmunógena heteróloga o fragmento), en el que el elemento IRES está operativamente situado de modo que la traducción de la secuencia codificante es por un mecanismo independiente del casquete dirigido por el elemento IRES y no por un mecanismo dependiente del casquete. El término "transcripción" como se usa en la presente memoria, incluye la producción de ARN a partir de un promotor subgenómico de alfavirus o un ácido nucleico replicón recombinante, que puede ser el mismo una molécula de ARN. Es decir, el promotor subgenómico en un replicón recombinante o molécula de ARN auxiliar puede dirigir la transcripción de un ARN mensajero que codifica un ácido nucleico heterólogo de interés o una proteína estructural de alfavirus. Por separado, el replicón recombinante o ácido nucleico auxiliar, se puede "replicar", es decir, copiar desde la secuencia de reconocimiento de replicación 5' por toda la secuencia de reconocimiento de replicación.

10 En las realizaciones del auxiliar de ARN y para producir el ARN replicón, se usa un promotor para sintetizar el ARN en una reacción de transcripción in vitro, y los promotores específicos adecuados para este uso incluyen los promotores de la ARN polimerasa de SP6, T7, y T3. En las realizaciones del ADN auxiliar, el promotor funciona dentro de una célula para dirigir la transcripción del ARN. Los potenciales promotores para la transcripción in vivo de la construcción incluyen promotores eucariotas tales como promotores de la ARN polimerasa II, promotores de la ARN polimerasa III o promotores víricos tales como MMTV y MoSV LTR, región temprana de SV40, RSV o CMV. Están disponibles en la técnica muchos otros promotores de mamífero y víricos adecuados. Alternativamente, se pueden usar promotores de ARN polimerasa dirigida por ADN de bacterias o bacteriófagos, p. ej., SP6, T7, y T3, para usar in vivo, proporcionando a la célula la ARN polimerasa de emparejamiento, mediante un plásmido separado, vector de ARN o vector vírico. En una realización específica, la ARN polimerasa de emparejamiento se puede transformar establemente en una línea de células auxiliares bajo el control de un promotor inducible.

15 Las construcciones de ADN que funcionan dentro de una célula pueden funcionar como plásmidos autónomos transfectedos en la célula o se pueden transformar de forma estable en el genoma. En estas realizaciones, el promotor puede ser un promotor constitutivo, es decir, un promotor que cuando se introduce en una célula y se une operativamente a una secuencia corriente abajo, dirige la transcripción de la secuencia corriente abajo, tras la introducción en la célula, sin la necesidad de añadir moléculas inductoras o un cambio a las condiciones de inducción. Alternativamente, el promotor puede ser inducible, de modo que la célula sólo produce ARN mensajero funcional codificado por la construcción cuando la célula se expone al estímulo adecuado (inductor). Cuando se usa un promotor inducible, las construcciones auxiliares se introducen en la célula de empaquetamiento de forma simultánea con, antes de o después de la exposición al inductor, y la expresión de las proteínas estructurales de alfavirus se produce cuanto están presentes tanto las construcciones como el inductor. Alternativamente, las construcciones diseñadas para funcionar dentro de una célula se pueden introducir en la célula mediante un vector vírico, p. ej., adenovirus, poxvirus, virus adenoasociados, SV40, retrovirus, nodavirus, picornavirus, virus de estomatitis vesicular, y baculovirus con promotores pol II de mamífero.

Una vez que el transcrito de ARN (ARNm) que codifica los vectores de replicones de ARN o auxiliares está presente en la célula auxiliar (sea por procedimientos in vitro o in vivo, como se ha descrito antes), finalmente es traducido para producir los polipéptidos o proteínas codificados. En algunas realizaciones, el replicón de vector de ARN se transcribe in vitro desde un plásmido de ADN y después se introduce en la célula auxiliar por electroporación.

45 El replicón de vector de ARN se diseña para que exprese una o más secuencias codificantes heterólogas o ARN funcional(es) de interés, también denominados en la presente memoria un ARN heterólogo o secuencia heteróloga, que en el presente contexto es la secuencia que codifica la proteína o polipéptido inmunógeno y que se puede seleccionar de una amplia variedad de secuencias inmunógenas procedentes de virus, procariotas o eucariotas. Los ejemplos de dichas secuencias heterólogas inmunógenas incluyen, pero no se limitan a, inmunógenos (incluyendo proteínas antígenas sintéticas o modificadas, nativas, péptidos, epítomos o fragmentos inmunógenos), proteínas de fusión, antígenos de cáncer o tumor, polipéptidos aberrantes asociados con una enfermedad, es decir, Alzheimer. Las ARP que expresan dichas entidades inmunógenas se usan en combinación con preparaciones inmunógenas que no son de ARP. Dichas preparaciones pueden incluir un antígeno, un inmunógeno o polipéptido o péptido inmunógeno, una proteína de fusión, un péptido de fusión, un antígeno de cáncer o tumor, un polipéptido aberrante responsable de una enfermedad, p. ej., Alzheimer. Los ejemplos de dichos polipéptidos y péptidos inmunógenos adecuados para proteger un sujeto contra una enfermedad, incluyen, pero no se limitan a enfermedades microbianas, bacterianas, protozoarias, parasitarias y víricas. Estas preparaciones inmunógenas pueden estar en forma de una proteína purificada o fragmentos de proteína extraídos de la fuente (es decir, el virus, procariota o eucariota), o se pueden clonar y producir por técnicas recombinantes bien conocidos en la materia.

60 Cualquier aminoácido que aparece en las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en la memoria descriptiva tienen sus abreviaturas de tres letras y de una letra habituales usadas en la técnica: A, Ala, Alanina; C,

Cys, Cisteína; D, Asp, ácidos aspártico; E, Glu, ácido glutámico; F, Phe, fenilalanina; G, Gly, Glicina; H, His, Histidina; I, Ile, Isoleucina; K, Lys, Lisina; L, Leu, Leucina; M, Met, Metionina; N, Asn, Asparagina; P, Pro, Prolina; Q, Gln, Glutamina; R, Arg, Arginina; S, Ser, Serina; T, Thr, Treonina; V, Val, Valina; W, Try, Triptófano; Y, Tyr, Tirosina.

5 Como se usa en la presente memoria, la expresión dirigida por una secuencia particular es la transcripción de una secuencia asociada corriente abajo. Si es adecuado y conveniente para la secuencia asociada, el término expresión también abarca la traducción (síntesis de proteínas) del ARN transcrito o introducido. Alternativamente, se pueden usar diferentes secuencias para dirigir la transcripción y traducción.

10 Las células permisivas a alfavirus son células que, tras la transfección con un transcrito de ARN vírico completo, son capaces de producir partículas víricas. Los alfavirus tienen una amplia variedad de hospedantes. Los ejemplos de células de empaquetamiento adecuadas incluyen, pero no se limitan a células Vero, de riñón de cría de hámster (BHK), fibroblastos de embrión de pollo (CEF), DF-1, 293, 293T, de ovario de hámster chino (CHO) y células de insecto.

15 Las frases "proteína estructural" o "proteína estructural de alfavirus" como se usan en la presente memoria, se refieren a una o más proteínas codificadas por alfavirus que son necesarias para el empaquetamiento del replicón de ARN, y típicamente incluyen la proteína de la cápside, glicoproteína E1 y glicoproteína E2 en el alfavirus maduro (algunos alfavirus, como el virus del bosque de Semliki, contienen una proteína adicional, E3, en el recubrimiento maduro). La expresión "proteína(s) estructural(es) de alfavirus" se refiere a una o una combinación de las proteínas estructurales codificadas por alfavirus. Estas son sintetizadas (a partir del genoma vírico) como una poliproteína y se representan en general en la bibliografía como C-E3-E2-6k-E1. E3 y 6k sirven como señales de translocación/transporte de membrana para las dos glicoproteínas E2 y E1. Por lo tanto, el uso del término E1 en la presente memoria se puede referir a E1, E3-E1, 6k-E1, o E3-6k-E1, y el uso del término E2 en la presente memoria se puede referir a E2, E3-E2, 6k-E2, o E3-6k-E2.

25 Como se describe en la presente memoria, las proteínas estructurales de los alfavirus están distribuidas entre una o más moléculas de ácido nucleico auxiliares (p. ej., un primer ARN auxiliar (o ADN) y un segundo ARN auxiliar (o ADN)). Además, una o más proteínas estructurales pueden estar situadas en la misma molécula que el ácido nucleico replicón, con la condición de que al menos una proteína estructural sea eliminada del ARN replicón de modo que el replicón y la partícula de alfavirus resultante sean defectuosos en la replicación. Como se usa en la presente memoria, los términos "eliminado" o "eliminación" significa la eliminación total del segmento especificado o la eliminación de una parte suficiente del segmento especificado para hacer al segmento inoperativo o no funcional, de acuerdo con el uso convencional. Véase, p. ej., la patente de EE.UU. n° 4.650.764 de Temin et al. La expresión "replicación defectuosa" como se usa en la presente memoria es sinónima de "propagación defectuosa", y significa que las partículas producidas en una célula hospedante dada no pueden producir partículas progenie en la célula hospedante, debido a la ausencia de la función del auxiliar, es decir, las proteínas estructurales de alfavirus necesarias para el empaquetamiento del ácido nucleico replicón. Sin embargo, el ácido nucleico replicón es capaz de replicarse a sí mismo y ser expresado en la célula hospedante en la que se ha introducido.

35 Se describen métodos para la producción económica y eficaz de partículas con alto rendimiento en la patente de EE.UU. n° 7.078.218, presentada el 18 de julio, 2006, así como cepas y virus atenuados específicos útiles para la expresión de una proteína antigénica o polipéptido de interés.

40 La célula auxiliar, también denominada una célula de empaquetamiento, usada para producir las partículas de alfavirus infecciosas de replicación defectuosa, debe expresar o ser capaz de expresar suficientes proteínas estructurales de alfavirus para empaquetar el ácido nucleico replicón. Las proteínas estructurales se pueden producir a partir de un conjunto de moléculas de ARN, típicamente dos que son introducidas en la célula auxiliar simultáneamente con o antes de la introducción del vector replicón. El primer ARN auxiliar incluye ARN que codifica al menos una proteína estructural de alfavirus pero no codifica todas las proteínas estructurales de alfavirus. El primer ARN auxiliar puede comprender ARN que codifica la glicoproteína E1 de alfavirus, pero no codifica la proteína de la cápside del alfavirus ni la glicoproteína E2 del alfavirus. Alternativamente, el primer ARN auxiliar puede comprender ARN que codifica la glicoproteína E2 de alfavirus, pero no codifica la proteína de la cápside del alfavirus ni la glicoproteína E1 del alfavirus. En una realización adicional, el primer ARN auxiliar puede comprender ARN que codifica la glicoproteína E1 de alfavirus y la glicoproteína E2 del alfavirus, pero no la proteína de la cápside del alfavirus. En una cuarta realización, el primer ARN auxiliar puede comprender ARN que codifica la cápside del alfavirus, pero no las glicoproteínaa del alfavirus. En una quinta realización, el primer ARN auxiliar puede comprender ARN que codifica la cápside y una de las glicoproteínas, es decir E1 o E2, pero no ambas.

55 En combinación con uno cualquiera de estos primeros ARN auxiliares, el segundo ARN auxiliar codifica al menos una proteína estructural de alfavirus no codificada por el primer ARN auxiliar. Por ejemplo, cuando el primer ARN auxiliar codifica solo la glicoproteína E1 del alfavirus, el segundo ARN auxiliar puede codificar una o ambas de la proteína de cápside y la glicoproteína E2 del alfavirus. Cuando el primer ARN auxiliar codifica solo la proteína de la cápside del alfavirus, el segundo ARN auxiliar puede incluir ARN que codifica una o ambas de las glicoproteínas del alfavirus. Cuando el primer ARN auxiliar codifica solo la glicoproteína E2 del alfavirus, el segundo ARN auxiliar puede codificar una o ambas de la proteína de cápside del alfavirus y la glicoproteína E1 del alfavirus. Cuando el primer ARN auxiliar codifica tanto la cápside como la glicoproteína E1 del alfavirus, el segundo ARN auxiliar puede

incluir ARN que codifica una o ambas de la proteína de cápside del alfavirus y la glicoproteína E2 del alfavirus.

En todos los ácidos nucleicos auxiliares, se entiende que estas moléculas además comprenden secuencias necesarias para la expresión (que abarcan señales de traducción y cuando sea necesario, de transcripción o replicación) de la secuencias de proteínas estructurales codificadas en las células auxiliares. Dicha secuencias pueden incluir, por ejemplo, promotores (víricos, procariotas o eucariotas, inducibles o constitutivos), elementos IRES, y secuencias de reconocimiento de replicasa vírica 5' y 3'. En el caso de los ácidos nucleicos auxiliares que expresan una o más glicoproteínas, se entiende en la técnica, que estas secuencias son expresadas de forma ventajosa con una secuencia líder o señal en el extremo N de la región codificante de la proteína estructural en las construcciones de ácidos nucleicos. La secuencia líder o señal se puede obtener de alfavirus, por ejemplo E3 o 6k, o puede ser una secuencia heteróloga tal como un péptido señal activador de plasminógeno tisular o una secuencia sintética. Por lo tanto, como un ejemplo, un primer ácido nucleico auxiliar puede ser una molécula de ARN que codifica cápside-E3-E1, y el segundo ácido nucleico auxiliar puede ser una molécula de ARN que codifica cápside-E3-E2. Alternativamente, el primer ARN auxiliar puede codificar sólo la cápside, y el segundo ARN auxiliar puede codificar E3-E2-6k-E1. Adicionalmente, la señal de empaquetamiento o "secuencia de encapsidación" que está presente en el genoma vírico, no está presente en ninguno de los ácidos nucleicos auxiliares. Preferiblemente, la señal de empaquetamiento se elimina de todos los ácidos nucleicos auxiliares.

Estos ARN auxiliares se pueden introducir en las células en una serie de formas. Pueden ser expresados a partir de uno o más casetes de expresión que se han transformado establemente en las células, estableciendo así líneas celulares de empaquetamiento (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. n.º 6.242.259). Alternativamente, los ARN se pueden introducir como moléculas de ARN o ADN que pueden ser expresadas en la célula auxiliar sin integración en el genoma celular. Los métodos de introducción incluyen electroporación, vectores víricos (p. ej., SV40, adenovirus, nodavirus, astrovirus), y transfección mediada por lípidos.

Una alternativa a los múltiples ARN auxiliares es el uso de una sola molécula de ADN, que codifica todos los polipéptidos necesarios para el empaquetamiento del ARN replicón vírico en partículas de replicones de alfavirus infecciosas. El ADN auxiliar único se puede introducir en la célula de empaquetamiento por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a electroporación, transfección mediada por lípidos (lipofección), vectores víricos (p. ej., adenovirus o SV40) o transfección mediada por fosfato de calcio. Preferiblemente, el ADN se introduce por métodos basados en electroporación. Típicamente, el ADN se introduce por electroporación en células con una disminución del voltaje y un aumento de la capacitancia, comparado con lo requerido para la absorción de ARN. En todas las electroporaciones, el valor para el voltaje y la capacitancia se deben ajustar para evitar destruir la capacidad de las células de empaquetamiento (hospedantes) para producir partículas de alfavirus infecciosas. Alternativamente, la función auxiliar en este formato y bajo un promotor inducible, se puede incorporar en el genoma de las células de empaquetamiento antes de la introducción/expresión del replicón de vector de ARN, y después inducir con el estímulo adecuado justo antes, simultáneamente, o después de la introducción del replicón de vector de ARN.

Uno o más de los ácidos nucleicos que codifican las proteínas estructurales de alfavirus, es decir, la cápside, glicoproteína E1 y glicoproteína E2 o la construcción de replicón, pueden contener una o más mutaciones de atenuación. Las frases "mutación atenuante" y "aminoácido atenuante", como se usan en la presente memoria, significan una mutación de nucleótidos (que puede estar o no en una región del genoma vírico que codifica polipéptidos) o un aminoácido codificado por una mutación de nucleótido, que en el contexto de un virus vivo, da como resultado una menor probabilidad de que el alfavirus produzca enfermedad en su hospedante (es decir, una pérdida de virulencia), de acuerdo con la terminología convencional en la técnica, véase, B. Davis, et al., *Microbiology* 156-158, (4ª ed. 1990), sea la mutación una mutación por sustitución, o una mutación por eliminación o adición en el marco. La frase "mutación atenuante" excluye las mutaciones que serían letales para el virus, salvo que dicha mutación se use en combinación con una mutación de "restauración" que convierte al virus en viable, pero atenuado. Los métodos para identificar mutaciones de atenuación adecuadas en el genoma de alfavirus son conocidos en la técnica. Olmsted et al. (1984; *Science* 225:424) describen un método de identificación de mutaciones atenuantes en el virus Sindbis seleccionando el crecimiento rápido en el cultivo celular. Johnston y Smith (1988; *Virology* 162:437) describen la identificación de mutaciones atenuantes en VEE aplicando presión selectiva directa para la penetración acelerada de células BHK. Las mutaciones atenuantes en alfavirus se han descrito en la técnica, p. ej. White et al. 2001 *J. Virology* 75:3706; Kinney et al. 1989 *Virology* 70:19; Heise et al. 2000 *J. Virology* 74:4207; Bernard et al 2000 *Virology* 276:93; Smith et al 2001 *J. Virology* 75:11196; Heidner and Johnston 1994 *J. Virology* 68:8064; Klimstra et al. 1999 *J. Virology* 73:10387; Glasgow et al. 1991 *Virology* 185:741; Polo and Johnston 1990 *J. Virology* 64:4438; y Smerdou and Liljestrom 1999 *J. Virology* 73:1092.

En algunas realizaciones, los ARN replicones comprenden al menos una mutación atenuante. En otras realizaciones específicas, el o los ácidos nucleicos auxiliares incluyen al menos una mutación atenuante. En realizaciones que comprenden dos moléculas de ácido nucleico auxiliares, al menos una molécula incluye al menos una mutación atenuante, o ambas pueden codificar al menos una mutación atenuante. Alternativamente, el ácido nucleico auxiliar, o al menos uno del primero o el segundo ácido nucleico auxiliar incluye al menos dos, o múltiples, mutaciones atenuantes. Las mutaciones atenuantes adecuadas dependen del alfavirus usado. Por ejemplo, cuando el alfavirus es el VEE, las mutaciones atenuantes adecuadas se pueden seleccionar del grupo que consiste en codones en la posición de aminoácido 76 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina, arginina, o

histidina como el aminoácido 76 de E2; codones en la posición de aminoácido 120 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina como el aminoácido 120 de E2; codones en la posición de aminoácido 209 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina, arginina o histidina como el aminoácido 209 de E2; codones en el aminoácido 272 de E1 que especifican una mutación atenuante, preferiblemente treonina o serina como el aminoácido 272 de E1; codones en el aminoácido 81 de E1 que especifican una mutación atenuante, preferiblemente isoleucina o leucina como el aminoácido 81 de E1; y codones en el aminoácido 253 de E1 que especifican una mutación atenuante, preferiblemente serina o treonina como el aminoácido 253 de E1. Las mutaciones atenuantes adicionales incluyen mutaciones de eliminaciones o sustitución en el dominio de escisión entre E3 y E2 de modo que la poliproteína E3/E2 no es escindida; esta mutación en combinación con la mutación en E1-253 es una cepa atenuada de ejemplo. Igualmente, se pueden usar mutaciones presentes en las cepas de vacunas vivas existentes, p. ej., la cepa TC83 (véase Kinney et al., 1989, *Virology* 170:19-30, en particular la mutación en el nucleótido 3).

Quando el alfavirus es el Arbovirus sudafricano nº 86 (S.A. AR86), las mutaciones de atenuación adecuadas se pueden seleccionar del grupo que consiste en los codones en la posición de aminoácido 538 de nsP1 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente isoleucina como el aminoácido 538 de nsP1; codones en la posición de aminoácido 304 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente treonina como la posición de aminoácido 304 de E2; codones en la posición de aminoácido 314 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina como el aminoácido 314 de E2; codones en la posición de aminoácido 376 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente alanina como el aminoácido 376 de E2; codones en la posición de aminoácido 372 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente leucina como el aminoácido 372 de E2; codones en la posición de aminoácido 96 de nsP2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente glicina como el aminoácido 96 de nsP2; y codones en la posición de aminoácido 372 de nsP2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente valina como el aminoácido 372 de nsP2. Las mutaciones atenuantes adecuadas útiles en las realizaciones en las que se usan alfavirus son conocidas por los expertos en la materia.

Las mutaciones atenuantes se pueden introducir en el ARN llevando a cabo mutagénesis dirigidas en el ADNc que codifica el ARN, de acuerdo con procedimientos conocidos. Véase, Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488 (1985), cuya descripción se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Alternativamente, las mutaciones se pueden introducir en el ARN por sustitución de fragmentos de restricción homólogos en el ADNc que codifica el ARN, de acuerdo con procedimientos conocidos, o en copias de ADNc usando métodos de reacción en cadena de la polimerasa mutagénicos.

Se conocen métodos para la preparación de partículas de replicones de alfavirus, altamente inmunógenas, de propagación defectuosa, infecciosas, con altos rendimientos. En las partículas de replicones de alfavirus (ARP), un vector de alfavirus, denominado en la presente memoria un replicón, se diseña para que contenga y exprese uno o más genes de interés, donde al menos un gen de interés es inmunógeno. El vector replicón de alfavirus puede proceder de cualquier alfavirus, tal como el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), virus Sindbis, p. ej., la cepa TR339, Arbovirus sudafricano nº 86, y virus del bosque de Semliki, entre otros. Después, el vector se introduce en células en cultivo que permiten la replicación de alfavirus y en las que también son expresadas las proteínas estructurales de los alfavirus, de modo que el vector se empaqueta mediante proteínas estructurales en ARP que finalmente son liberadas de la célula. La patente de EE.UU. nº 7.078.218 proporciona métodos eficaces para preparar partículas de replicones de alfavirus, altamente inmunógenas, de propagación defectuosa, infecciosas, con altos rendimientos.

Los expertos en la técnica reconocen que las secuencias codificantes pueden variar debido a la degeneración del código genético y el uso de codones. Todas las secuencias sinónimas que codifican el antígeno u otro polipéptido o proteína de interés, están incluidas dentro del alcance de esta solicitud.

Adicionalmente, los expertos en la técnica reconocen que pueden aparecer variaciones alélicas en las secuencias codificantes que no cambian significativamente la actividad de las secuencias de aminoácidos de los péptidos que esas secuencias codifican. Todas dichas secuencias de ADN equivalentes están incluidas dentro del alcance de esta solicitud y la definición de un promotor.

Las técnicas convencionales de clonación, aislamiento de ADN, amplificación y purificación, para reacciones enzimáticas que implican ADN ligasa, ADN polimerasa, endonucleasas de restricción y similares, y diferentes técnicas de separación, son los conocidos y usados habitualmente por los expertos en la técnica. Se describen una serie de técnicas convencionales en Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York; Maniatis et al. (1982) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York; Wu (ed.) (1993) *Meth. Enzymol.* 218, Part I; Wu (ed.) (1979) *Meth. Enzymol.* 68; Wu et al. (eds.) (1983) *Meth. Enzymol.* 100 and 101; Grossman and Moldave (eds.) *Meth. Enzymol.* 65; Miller (ed.) (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Old and Primrose (1981) *Principles of Gene Manipulation*, University of California Press, Berkeley; Schleif and Wensink (1982) *Practical Methods in Molecular Biology*; Glover (ed.) (1985) *DNA Cloning* Vol I and II, IRL Press, Oxford, UK; Hames and Higgins (eds.) (1985) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, UK; Setlow and Hollaender (1979) *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Vols. 1-4, Plenum Press, New York; y Ausubel et al. (1992) *Current Protocols*

in Molecular Biology, Greene/Wiley, New York, NY. Las abreviaturas y la nomenclatura, donde se usan, se consideran convencionales en el campo y usadas habitualmente en revistas profesionales tales como las citadas en la presente memoria.

5 Las formulaciones farmacéuticas, tales como vacunas u otras composiciones inmunógenas, comprenden una cantidad inmunógena de partículas de replicones de alfavirus infecciosas, de propagación defectuosa, o partículas atenuadas, vivas, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad inmunógena" es una cantidad de partículas de alfavirus infecciosas que es suficiente para provocar una respuesta inmunitaria en el sujeto al que se administra la formulación farmacéutica. Se cree que es adecuada una cantidad de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^9 , en especial de 10^6 a 10^8 , unidades infecciosas, o ARP por dosis, dependiendo de la edad y la especie del sujeto que se va a tratar. Los vehículos farmacéuticamente aceptables de ejemplo incluyen, pero no se limitan a agua estéril exenta de pirógenos y solución salina fisiológica estéril exenta de pirógenos. Los sujetos a los que se pueden administrar cantidades inmunógenas de las partículas de replicones de alfavirus infecciosas, de replicación defectuosa, incluyen seres humanos y animales (p. ej., perro, gato, ganado, caballo, burro, ratón, hámster, monos, cobayas, aves, huevos). La administración puede ser por cualquier medio adecuado tal como administración intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, intranasal, intravaginal, intratecal, subcutánea o intravenosa.

20 Se pueden incorporar una o más moléculas inmunopotenciadoras, tales como quimioquinas y/o citoquinas, en las composiciones inmunógenas que comprenden las partículas de replicones de alfavirus como se describe en la presente memoria. Alternativamente, las composiciones inmunógenas pueden comprender partículas de replicones de alfavirus que dirigen la expresión o una o más quimioquinas y/o citoquinas en el paciente o animal al que se administra la composición. Las quimioquinas y/o citoquinas de ejemplo incluyen, sin limitación, interleuquina-4, interleuquina-12, interferón gamma, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, y ligando FLT-3. Se entiende que la elección de la quimioquina y/o citoquina puede variar según la neoplasia, parásito o patógeno al que se dirige para una respuesta inmunitaria. Alternativamente, se puede usar una ARP que expresa interleuquina-12.

30 Las composiciones inmunógenas que comprenden ARP (que dirigen la expresión de la o las secuencias de interés cuando las composiciones se administran a un ser humano o animal), se pueden formular por cualquiera de los medios conocidos en la técnica. Dichas composiciones, en especial vacunas, típicamente se preparan como productos inyectables, sea como soluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la disolución o suspensión en líquido antes de inyección. También son adecuadas las preparaciones liofilizadas.

35 Los ingredientes inmunógenos activos (las ARP) a menudo se mezclan con excipientes o vehículos que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a agua estéril, disolución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos, así como estabilizantes, p. ej., HSA y otras proteínas adecuadas y azúcares reductores.

40 Además, si se desea, las vacunas pueden contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, y/o adyuvantes que potencian la eficacia de la vacuna. Los ejemplos de adyuvantes que se pueden ser eficaces incluyen, pero no se limitan a: hidróxido de aluminio, N-acetil-muramilo-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP); N-acetil-nor-muramilo-L-alanilo-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado nor-MDP); N-acetilmuramilo-L-alanilo-D-isoglutaminilo-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxisforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, denominado MTP-PE); y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil-lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno/Tween 80 al 2%. La eficacia de un adyuvante se puede determinar midiendo la cantidad de anticuerpos dirigidos contra el producto inmunógeno de las ARP que resulta de la administración del inmunógeno en vacunas que están compuestas también de diferentes adyuvantes. También se pueden usar dichas formulaciones adicionales y modos de administración como se conocen en la técnica.

50 Las composiciones inmunógenas (o biológicamente activas de otra forma) que contienen ARP se administran de una forma compatible con la formulación farmacéutica, y en una cantidad tal que sea profiláctica y/o terapéuticamente eficaz. La cantidad que se va a administrar, que en general está en el intervalo de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^9 unidades infecciosas por ml en una dosis, depende del sujeto que se va a tratar, la vía por la que se administran las ARP, la inmunogenicidad del producto de expresión, los tipos de respuestas inmunitarias efectoras deseadas, y el grado de protección deseado. Las cantidades exactas del principio activo necesarias para ser administradas, pueden depender del criterio del médico, veterinario y otro profesional sanitario, y puede ser particular para cada individuo, pero dicha determinación se basa en la experiencia de dicho profesional.

55 La vacuna u otra composición inmunógena se pueden dar en un régimen de una sola dosis o múltiples dosis. Un régimen de múltiples dosis es uno en el que un ciclo primario de vacunación puede incluir de 1 a 10 o más dosis separadas, seguido de otras dosis administradas en intervalos de tiempo posteriores según sea necesario para mantener y/o reforzar la respuesta inmunitaria, p. ej., semanalmente o de 1 a 4 meses para una segunda dosis, y si es necesario una dosis o dosis posteriores después de varios meses/años.

Las referencias citadas en la presente descripción reflejan el nivel de experiencia en las técnicas relevantes.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Alphavax, Inc.
Smith, Jonathan F.
Hubby, Bolyne
Copp, Laura
- <120> Partículas de replicones de alfavirus emparejadas con antígenos proteicos como adyuvantes inmunológicos
- <130> 139-06 WO
- <140> no cedida
- <141> 2007-09-12
- <150> US 60/825,395
- <151> 2006-09-12
- <160> 5
- <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Construcción sintética: oligonucleótido útil como cebador.
- <400> 1
ccttaattaa atgaagacta tcattgc 27
- <210> 2
- <211> 26
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Construcción sintética: oligonucleótido útil como cebador.
- <400> 2
ttggcgcgcc tcaaatgcaa atgttg 26
- <210> 3
- <211> 25
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Construcción sintética: oligonucleótido útil como cebador.
- <400> 3
cgtctagaat gaagactatc attgc 25
- <210> 4
- <211> 31
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Construcción sintética: oligonucleótido útil como cebador.
- <400> 4
taaaatctag attaaatgca aatgttgac c 31

ES 2 517 869 T3

<210> 5
 <211> 1701
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética: secuencia codificante de A/Wyoming/3/2003 generada a partir de ARN vírico por rPCR

<400> 5
 atgaagacta tcattgcttt aagctacatt ctatgcctgg ttttctctca aaagcttccc 60
 ggaaatgaca acagcacggc aacgctgtgc cttgggcacc atgcagtacc aaacggaacg 120
 atagtgaaaa caatcacgaa tgaccaaatt gaagttacta atgctactga gctggttcag 180
 agttcctcaa caggtggaat atgcgacagt cctcatcaga tccttgatgg agaaaactgc 240
 acactaatag atgctctatt gggagaccct cagtgtgatg gcttccaaaa taagaaatgg 300
 gacctttttg ttgagcgcag caaagcctac agcaactggt acccttatga tgtgccggat 360
 tatgcctccc ttaggtcact agttgcctca tccggcacac tggagttaa caatgaaagc 420
 ttcaattggg ctggagtcac tcagaatgga acaagctctg cttgcaaaag gagatctaata 480
 aaaagtttct ttagtagatt gaattgggtg acccacttaa aatacaataa cccagcattg 540
 aacgtgacta tgccaaacaa tgaaaaattt gacaaattgt acatttgggg ggttcaccac 600
 ccggttacgg acagtgacca aatcagccta tatgctcaag catcaggaag aatcacagtc 660
 tctaccaaaa gaagccaaca aactgtaatc ccgaatatcg gatatagacc cagggtaagg 720
 gatatctcca gcagaataag catctattgg acaatagtaa aaccgggaga catacttttg 780
 attaacagca caggaaatct aattgctcct cggggttact tcaaaatacg aagtgggaaa 840
 agctcaataa tgagatcaga tgcacccatt ggcaaatgca attctgaatg catcactcca 900
 aatggaagca ttcccaatga caaacattt caaaatgtaa acaggatcac atatggggcc 960
 tgtccagat atgttaagca aaacactctg aaattggcaa cagggatgcg aaatgtacca 1020
 gagaacaaca ctagaggcat atttggcgca atcgcgggtt tcatagaaaa tggttgggag 1080
 ggaatggtgg acggttggtg cggtttcagg catcaaaatt ctgagggcac aggacaagca 1140
 gcagatctca aaagcactca agcagcaatc aaccaaatac atgggaaact gaataggtta 1200
 atcgggaaaa caaacgagaa attccatcag attgaaaaag aattctcaga agtagaaggg 1260
 agaattcagg acctcgagaa atatggtgag gacactaaaa tagatctctg gtcatacaac 1320
 gcgagcttc ttgttgccct ggaaaaccaa catacaattg atctaactga ctcagaaatg 1380
 aacaaactgt ttgaaagacc aaagaagcaa ctgagggaaa atgctgagga tatgggcaat 1440
 ggttgtttca aatatacca caaatgtgac aatgcctgca tagagtcaat cagaaatgga 1500
 acttatgacc atgatgtata cagagatgaa gcattaaaca accggttcca gatcaaaggt 1560
 gttgagctga agtcaggata caaagattgg atcctatgga tttcctttgc catatcatgt 1620
 tttttgcttt gtgttgcttt gttggggttc atcatgtggg cctgcaaaaa aggcaacatt 1680
 aggtgcaaca tttgcattta a 1701

REIVINDICACIONES

- 1.- Partículas de replicones de virus de la encefalitis equina venezolana que expresan una proteína inmunógena, para usar en la potenciación de la respuesta inmunitaria contra la proteína inmunógena en un sujeto, en donde las partículas se administran a dicho sujeto simultáneamente con la proteína inmunógena, o
- 5 en donde las partículas y la proteína inmunógena se administran simultáneamente a dicho sujeto y en el mismo sitio.
- 2.- Partículas de replicones de virus de la encefalitis equina venezolana para el uso de la reivindicación 1, en donde la vía de administración es subcutánea, intradérmica, intramuscular, intranasal, intraperitoneal, gastrointestinal, rectal, vaginal o por la mucosa respiratoria.
- 3.- Partículas de replicones de virus de la encefalitis equina venezolana para el uso de la reivindicación 1, en donde la dosis de partículas de replicones de alfavirus es al menos 1×10^4 unidades infecciosas por ml, medido por ensayo en cultivo celular permisivo a alfavirus.
- 10 4.- Partículas de replicones de virus de la encefalitis equina venezolana para el uso de la reivindicación 3, en donde la dosis de partículas de replicones de alfavirus es al menos 1×10^5 unidades infecciosas por ml, medido por ensayo en cultivo celular permisivo a alfavirus; en donde opcionalmente, la dosis de partículas de replicones de alfavirus es al menos 1×10^6 unidades infecciosas por ml, medido por ensayo en cultivos celulares permisivos a alfavirus.
- 15 5.- Partículas de replicones de virus de la encefalitis equina venezolana para el uso de la reivindicación 1, en donde la dosis de proteína inmunógena usada es al menos 3 veces menor que la dosis de dicha proteína inmunógena requerida para proporcionar inmunización eficaz en ausencia de partículas de replicones de alfavirus que expresan dicha proteína inmunógena; en donde, opcionalmente, la dosis de proteína inmunógena usada es al menos 5 veces menor que la dosis de dicha proteína inmunógena requerida para proporcionar inmunización eficaz en ausencia de partículas de replicones de alfavirus que expresan dicha proteína inmunógena.
- 20 6.- Partículas de replicones de virus de la encefalitis equina venezolana para el uso de la reivindicación 1, en donde la respuesta inmunitaria es una respuesta humoral y la potenciación es al menos de 5 veces.
- 7.- Una composición de vacuna que comprende (a) proteína purificada y (b) partículas de replicones de virus de la encefalitis equina venezolana, capaces de expresar dicha proteína.
- 25 8.- Partículas de replicones de virus de la encefalitis equina venezolana para el uso de la reivindicación 1 o la composición de vacuna de la reivindicación 7, en donde la proteína es una proteína del virus influenza; en donde, opcionalmente, dicha proteína del virus influenza es una hemaglutinina o una neuraminidasa.
- 9.- Partículas de replicones de virus de la encefalitis equina venezolana para el uso de la reivindicación 1, en donde la proteína inmunógena es un antígeno proteico extraído de un microorganismo, virus, parásito, tumor o célula tumoral.
- 30 10.- Partículas de replicones de virus de la encefalitis equina venezolana para el uso de la reivindicación 1, en donde la proteína inmunógena se selecciona de una proteína, glicoproteína, lipoproteína, toxina, toxina atenuada, toxina inactivada, virus, antígeno de célula cancerosa, proteína bacteriana o parte de la misma, toxina inactivada u otra proteína bacteriana, proteína fúngica o parte de la misma, hongo atenuado, hongo inactivado, parásito o proteína o parte de la misma, proteína protozoaria o parte de la misma.
- 35 11.- Partículas de replicones de virus de la encefalitis equina venezolana para el uso de la reivindicación 1, en donde la proteína inmunógena procede de sarampión, paperas, rubéola, sarampión, vaccinia, virus del herpes, o en donde la proteína inmunógena se selecciona de toxinas de ántrax (atenuadas) y antígenos de *Bacillus anthracis*, antígenos de *Yersinia pestis*, toxina diftérica inactiva de *Corynebacterium diphtheriae*, toxina inactiva de *Clostridium botulinum*, especies de *Chlamydia*, *Mycobacterium tuberculosis*, o en donde la proteína inmunógena es cualquier antígeno de célula tumoral o cancerosa, opcionalmente seleccionado de antígenos HER2 y BRCA1, MART-1/MelanA, gp100, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, [beta]-catenina, MUM-1, Caspasa-8, KIAA0205, HPVE&, SART-1, PRAME, antígenos p15 y p53, antígeno de tumor de Wilms, tirosinasa, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico (PSA), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), antígeno de citoblastos prostáticos (PSCA), aspartil (asparaginil) [beta]-hidroxilasa humana (HAAH), y EphA2.
- 40 12.- Partículas de replicones de virus de la encefalitis equina venezolana para el uso de la reivindicación 1, en donde la proteína inmunógena se selecciona de antígenos proteicos de tejidos tumorales y/o células cancerosas, patógenos y parásitos; opcionalmente de bacterias seleccionadas de *Vibrio cholerae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonellae*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, Streptococcus, *Corynebacterium diphtheriae*, Staphylococcus, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*, especies de *Chlamydia*, *Mycobacterium tuberculosis*; opcionalmente de hongos seleccionados de Candida, Aspergillus; opcionalmente de protozoos seleccionados de Giardia, Amoebae, tripanosomas, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*,
- 45 50

5 Cryptosporidium, Cryptococcus, y toxinas de plantas, animales, dinoflagelados, algas o bacterianas, o en donde la proteína inmunógena es cualquier antígeno de célula tumoral o cancerosa, opcionalmente seleccionado de antígenos HER2 y BRCA1, MART-1/MelanA, gp100, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, [beta]-catenina, MUM-1, Caspasa-8, KIAA0205, HPVE&, SART-1, PRAME, antígenos p15 y p53, antígeno de tumor de Wilms, tirosinasa, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico (PSA), antígeno prostático específico de membrana (PSMA), antígeno de citoblastos prostáticos (PSCA), aspartil (asparaginil) [beta]-hidroxilasa humana (HAAH), y EphA2.

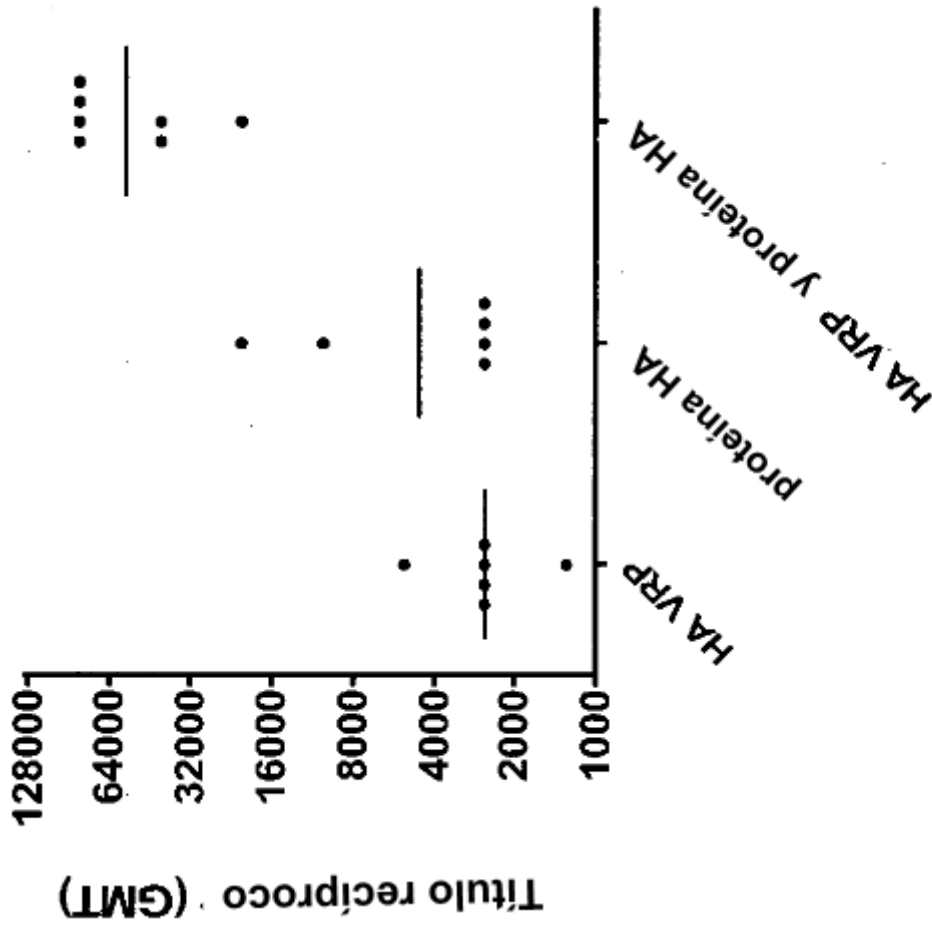


Fig. 1A

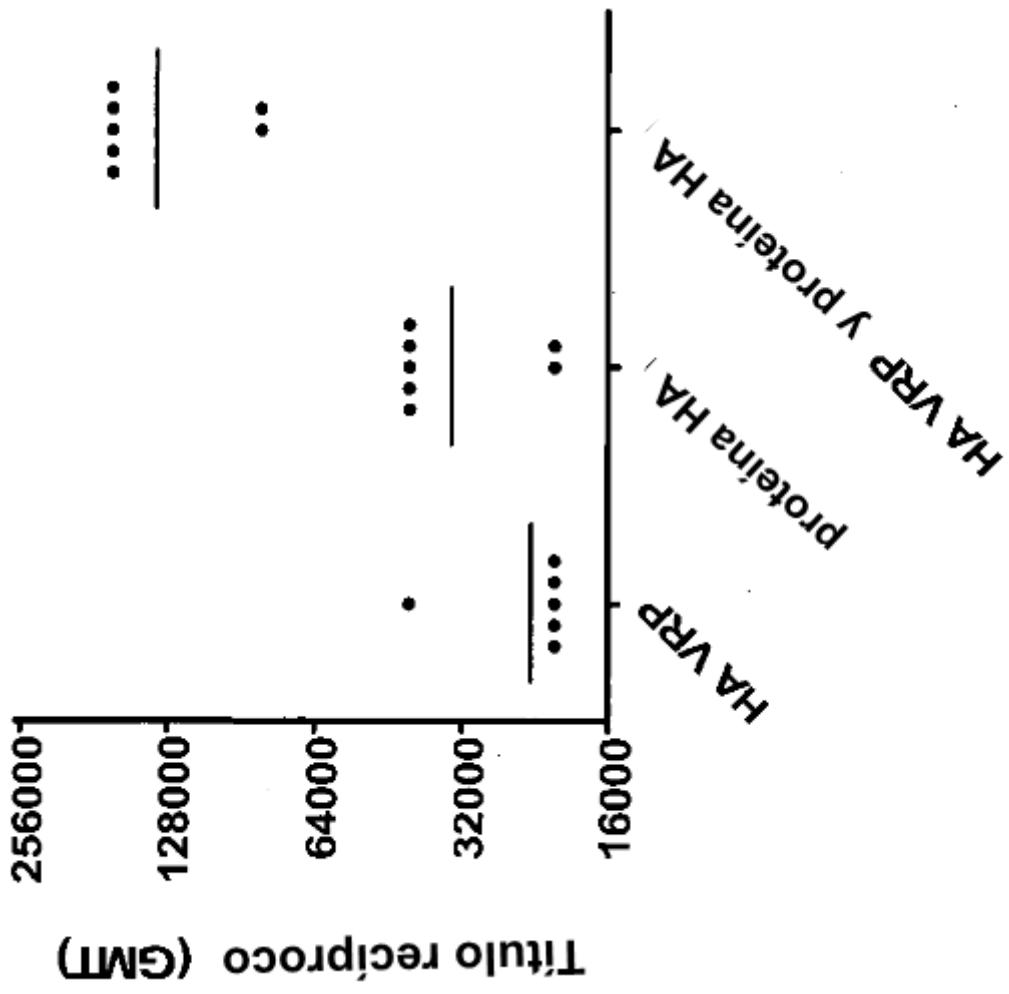


Fig. 1B

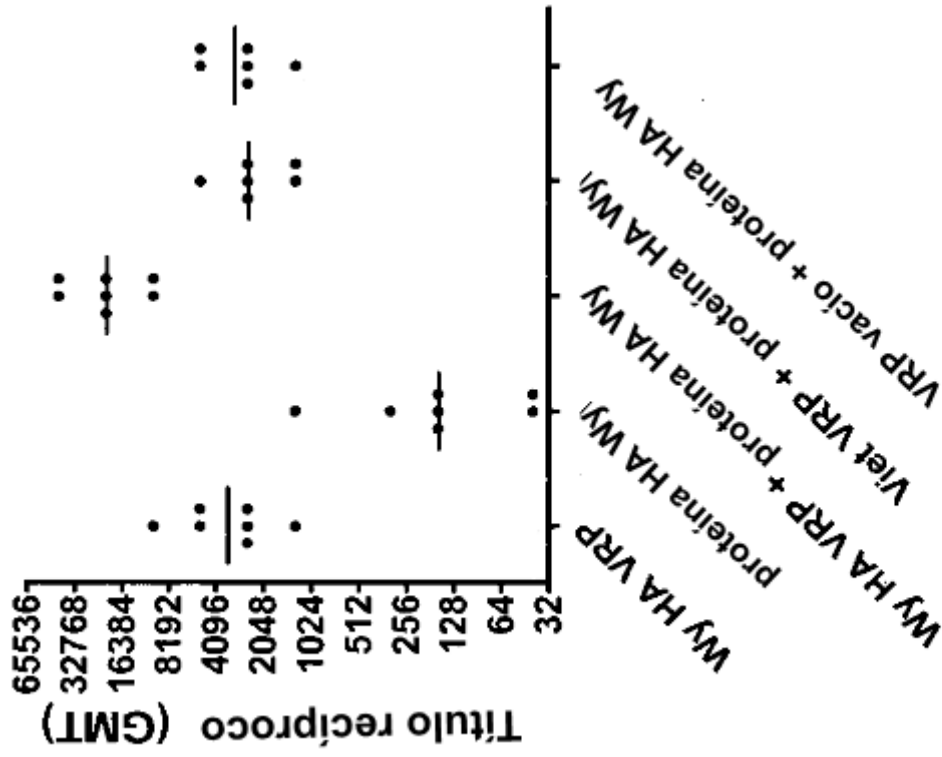


Fig. 2A

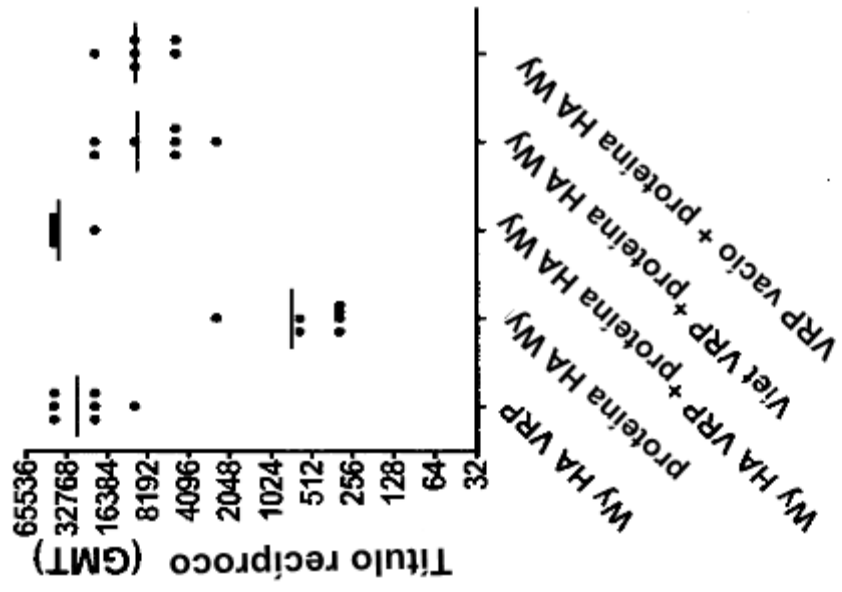


Fig. 2B

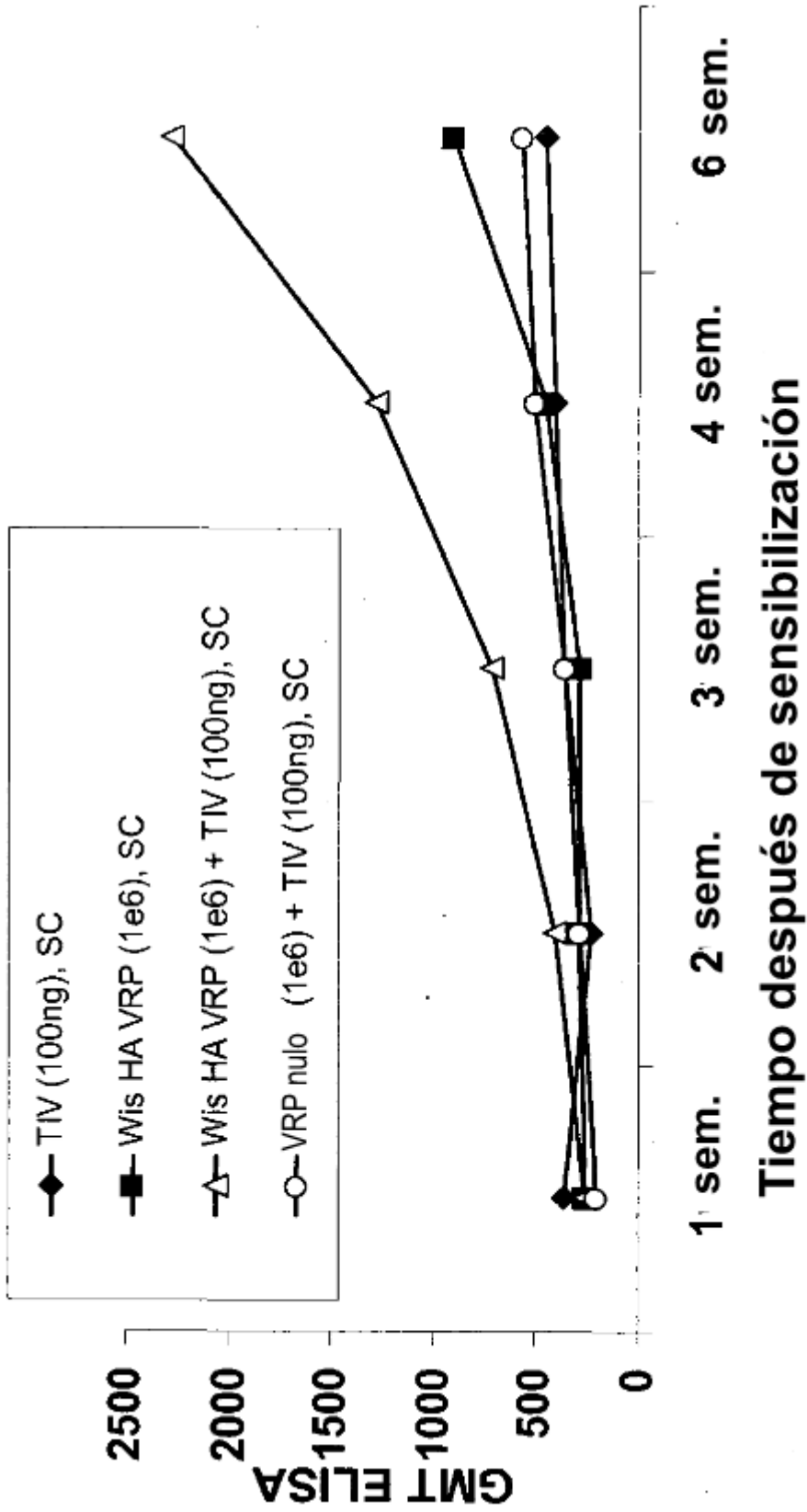
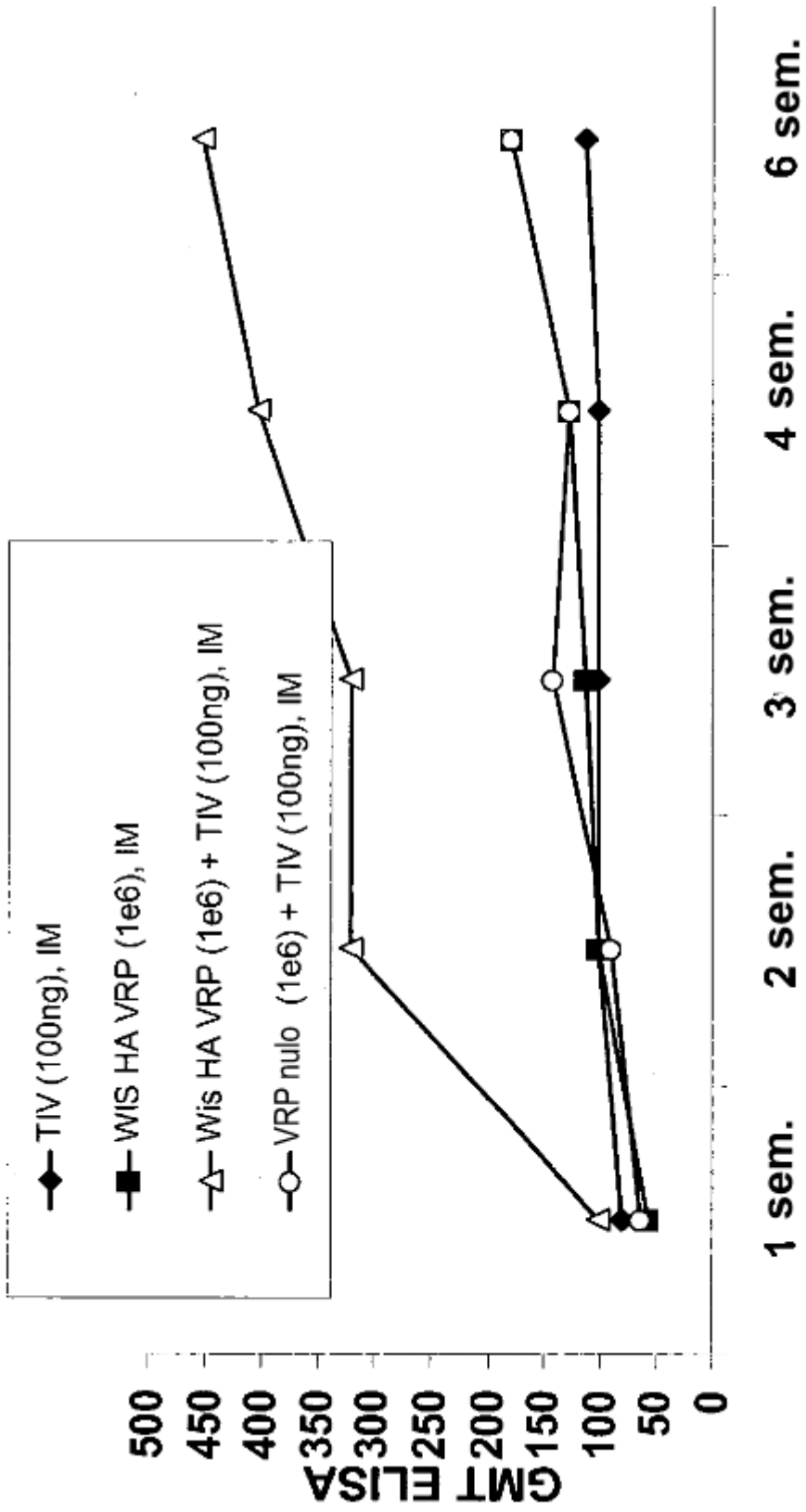
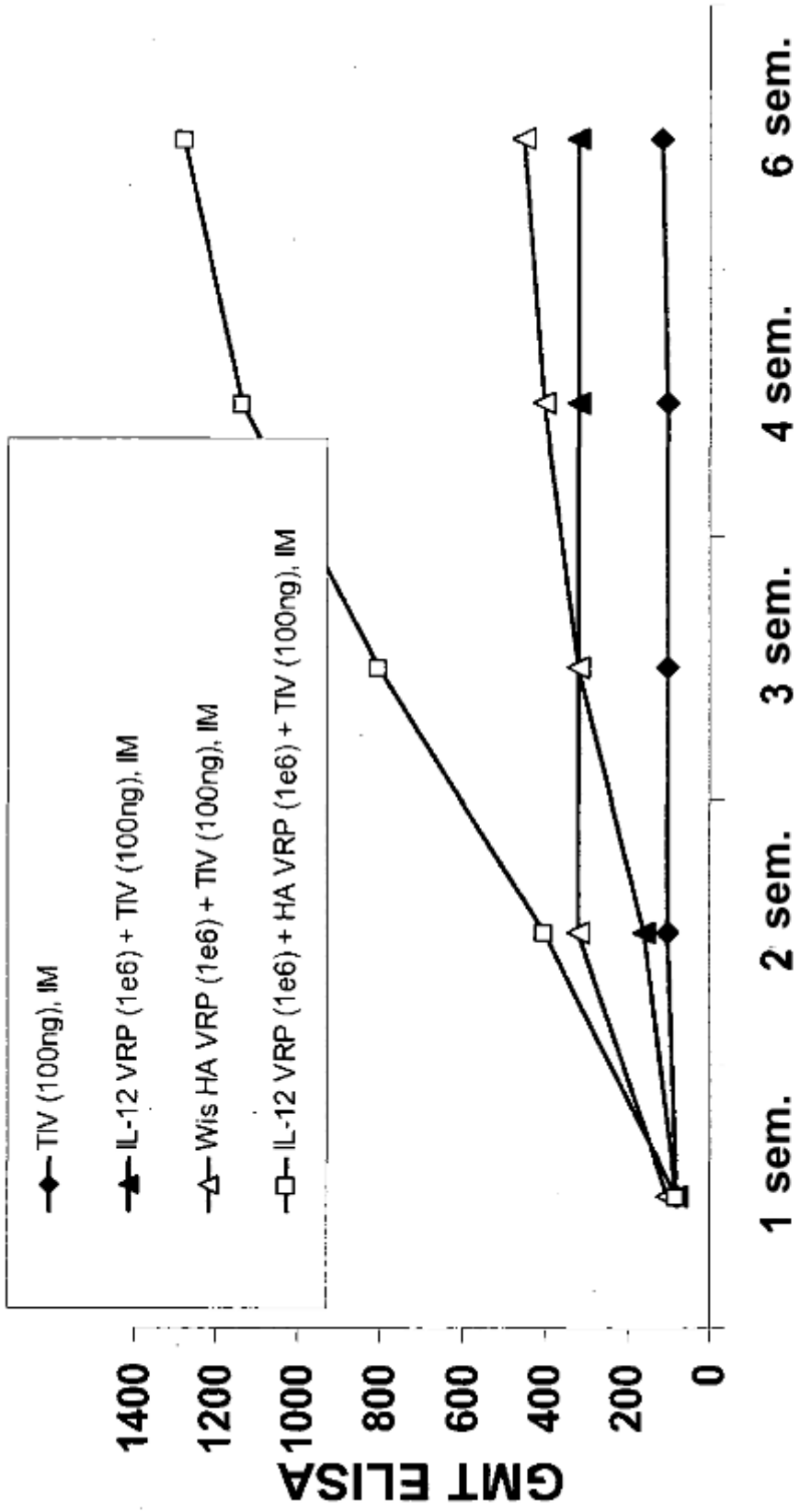


Fig. 3A



Tiempo después de sensibilización

Fig. 3B



Tiempo después de sensibilización

Fig. 4