

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 707**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2009 E 09764663 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2370584**

54 Título: **Uso de microRNAs para el control de ácidos nucleicos colaboradores de virus**

30 Prioridad:

01.12.2008 US 118954 P

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

29.12.2014

73 Titular/es:

**ALPHAVAX, INC. (100.0%)
2 Triangle Drive
Research Triangle Park, NC 27709 , US**

72 Inventor/es:

**COFFIELD III, VERNON, MCNEIL;
KAMRUD, KURT, I. y
SMITH, JONATHAN, F.**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 525 707 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

Uso de microRNAs para el control de ácidos nucleicos colaboradores de virus

5 Antecedentes

[0001] Las estrategias modernas de vacunación y terapia génica implican a menudo el uso de vectores víricos. Esto se basa en el hecho de que los virus han desarrollado técnicas útiles para la invasión del hospedador y la autopropagación. El objetivo es aprovechar esas técnicas para administrar antígenos inmunizantes desde un organismo o un virus patológico objetivo, incapacitando al mismo tiempo al propio virus de forma que no pueda propagarse y provocar una enfermedad en su hospedador. La estrategia más simple ha sido el uso de virus vivos atenuados, pero esta solución está limitada obviamente a las vacunas para enfermedades víricas. Aun así, existe una preocupación porque dichos virus atenuados pueden mutar y hacerse más virulentos para el hospedador. Una estrategia más dirigida es el diseño de un vector basado en un virus, pero proporcionar únicamente los elementos necesarios para que el virus se replique en una célula, en lugar de que se propague y se disemine por todo el hospedador. Los alfavirus han sido un tipo de virus atractivo para su uso en el diseño de dichos sistemas. Otros sistemas son los flavivirus, los herpesvirus, los lentivirus y los adenovirus.

[0002] Todos estos virus de ciclo único o restringido utilizan sistemas "colaboradores" que proporcionan por separado alguna función del virus parental del que derivan. Estos sistemas colaboradores son necesarios para la producción de partículas víricas individuales o restringidas, pero idealmente no son portados junto con esas partículas ni recombinados con los ácidos nucleicos de las partículas. Sin embargo, siempre que están presentes todas las porciones de un genoma vírico en una célula al mismo tiempo, incluso si sólo es temporalmente, existe la posibilidad de que esos elementos se recombinen para producir el virus parental.

[0003] Pushko y col. en "Replicon-Helper Systems from Attenuated Venezuelan Equine Encephalitis Virus: Expression of Heterologous Genes in Vitro and Immunization against Heterologous Pathogens in Vivo", *Virology* 239 (2): 389 - 401 (1997) divulgan constructos de colaboradores de alfavirus, que son profundamente mutados para producir cualquier virus resultante atenuado.

[0004] Barnes y col. en "Harnessing endogenous miRNAs to control virus tissue tropism as a strategy for developing attenuated virus vaccines", *Cell Host and Microbe*, vol. 4, nº 3, 11 de septiembre de 2008 (2008-09-11), páginas 239 - 248, divulgan una estrategia general para un diseño racional de vacunas de virus vivos seguras y eficaces que se aprovechan de la maquinaria de silenciamiento génica basada en microARN para controlar la replicación de poliovirus. Se divulga que pueden incorporarse secuencias de miARN objetivo en el genoma de un poliovirus, que pueden y de hecho dan lugar a eludir la inhibición del miARN mediada por el virus en un sujeto infectado.

[0005] Kelly y col. en "Engineering microRNA responsiveness to decrease virus pathogenicity", *Nature Medicine*, Nature Publishing Group, Nueva York, EE.UU., vol. 14, nº 11, 1 de noviembre de 2008 (2008-11-01), páginas 1278 - 1283, divulgan que pueden incorporarse secuencias de miARN de miARN endógenos en el genoma completo de un picornavirus, que pueden y de hecho dan lugar a eludir la inhibición del miARN mediada por el virus en un sujeto infectado.

[0006] La solicitud internacional WO 2004/085660 divulga numerosos constructos colaboradores útiles para la expresión de proteínas estructurales de alfavirus en la producción de ARPs.

Resumen de la divulgación

[0007] En el presente documento se proporcionan ácidos nucleicos colaboradores según se define en las reivindicaciones que comprenden al menos una secuencia objetivo del microARN de un microARN endógeno celular y un ácido nucleico que codifica para una proteína vírica, en las que la secuencia objetivo del microARN está ubicada en la región no traducida o traducida del ácido nucleico que codifica para la proteína vírica. La proteína vírica es una proteína estructural o una proteína esencial para la replicación del virus. La proteína vírica es una proteína estructural de un alfavirus. También se proporcionan sistemas de vector, composiciones y células que comprenden los ácidos nucleicos colaboradores proporcionados, y un vector o replicón.

[0008] Se proporcionan métodos según se definen en las reivindicaciones para la elaboración de partículas de replicón semejantes a virus (VRP) (por ejemplo, partículas de replicón semejantes a alfavirus (ARP)) que comprenden la transfección de una célula con un replicón, en la que el replicón comprende una señal de empaquetamiento y uno o más de los ácidos nucleicos colaboradores descritos en el presente documento. Las proteínas necesarias para crear las VRP están codificadas por uno o más de la célula, el replicón o el ácido nucleico colaborador. Entonces la célula se cultiva en unas condiciones que permitan la producción de las partículas de replicón semejantes a virus ensambladas que comprenden el replicón.

65

[0009] Se proporcionan poblaciones de partículas de replicón semejantes a alfavirus (ARP) que comprenden (i) un primer subconjunto de partículas que comprende un replicón y (ii) un segundo subconjunto de partículas que comprende el uno o más ácidos nucleicos colaboradores proporcionados, o un fragmento de los mismos, y un replicón.

5

[0010] Los detalles de una o más de las composiciones y los métodos se establecen en los dibujos anexos y en la siguiente descripción. Otras características, objetos y ventajas serán apreciables a partir de la descripción y de los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

10 Descripción de los dibujos

[0011]

15 La Figura 1 es una representación esquemática de la ubicación de los miARN objetivo modificados en la UTR en 3' de un ácido nucleico que codifica para una proteína estructural. Puede aparecer una longitud de nucleótidos de 1.533 pares de bases cuando la proteína estructural es, por ejemplo, la proteína de la cápside. La longitud de nucleótidos de 1.533 pares de bases se mide desde el extremo del promotor T7 hacia el sitio de restricción NotI.

20 La Figura 2 es una representación esquemática de la ubicación de los miARN objetivo modificados en la UTR en 5' de un ácido nucleico que codifica para una proteína estructural. Puede aparecer una longitud de nucleótidos de 1.533 pares de bases cuando la proteína estructural es, por ejemplo, la proteína de la cápside. La longitud de nucleótidos de 1.533 pares de bases se mide desde el extremo del promotor T7 hacia el sitio de restricción NotI.

25 La Figura 3 es una representación esquemática de la ubicación de los miARN objetivo modificados en la UTR en 5' y en 3' de un ácido nucleico que codifica para una proteína estructural. Puede aparecer una longitud de nucleótidos de 1.647 pares de bases cuando la proteína estructural es, por ejemplo, la proteína de la cápside. La longitud de nucleótidos de 1.647 pares de bases se mide desde el extremo del promotor T7 hacia el sitio de restricción NotI.

30 La Figura 4 es una inmunotransferencia Western de la expresión de la proteína de la cápside y de la glucoproteína (gp) mediante el uso de colaboradores de la cápside y de la gp con secuencias de microARN objetivo emparejadas. Se electroporaron células Vero con conjuntos de tres ARNs como sigue: (i) un vector de replicón, con un colaborador de la cápside que comprende los miARN objetivo RC1-6 y colaborador de gp que comprende los miARN objetivo RC1-6, o (ii) un vector de replicón, con colaboradores de la cápside y de la gp que comprenden bien los miARN RC1-3 objetivo o bien los miARN RC4-6 objetivo. Cada una de las combinaciones de colaborador y replicón se electroporaron en presencia y en ausencia de los inhibidores de miARN (oligonucleótidos de ARN metilados en 2'-O) específicos para completar completamente el miARN objetivo presente en los colaboradores. Las combinaciones de ARN colaborador con los miARN objetivo RC1-3 o los RC4-6 también se electroporaron en presencia de los inhibidores de miARN no emparejados para demostrar la especificidad de los inhibidores usados. Las células electroporadas se sembraron en medio y se incubaron durante una noche. Después de la incubación (~ 18 horas), se recogieron las partículas de replicón del virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEE RP).

40 La Figura 5 es una inmunotransferencia Northern de la replicación del ARN de la cápside y de la gp mediante el uso de colaboradores de la cápside y de la gp con secuencias de microARN objetivo emparejadas e inhibidores. Las muestras se prepararon según se ha descrito en la Figura 4.

45 La Figura 6 es un gráfico que muestra los rendimientos de las VEE RP mediante el uso de colaboradores de la cápside y de la gp con secuencias de microARN objetivo emparejadas e inhibidores. Las muestras se prepararon según se ha descrito en la Figura 4.

50 La Figura 7 es una inmunotransferencia Western de la expresión de la proteína de la cápside y de la glucoproteína (gp) mediante el uso de colaboradores de la cápside y de la gp con secuencias de microARN objetivo no emparejadas e inhibidores. Las combinaciones de un colaborador de la cápside con las secuencias de los miARN RC1-3 objetivo y una colaboradora de gp con las secuencias de los miARN RC4-6 objetivo (y viceversa) se electroporaron en presencia y en ausencia de los 6 inhibidores del miARN (oligonucleótidos de ARN metilados en 2'-O) específicos para completar completamente el miARN objetivo presente en ambos colaboradores. Las células electroporadas se sembraron en medio y se incubaron durante una noche. Después de la incubación (~ 18 horas), se recogieron las VEE RP.

55 La Figura 8 es una inmunotransferencia Northern de la replicación del ARN de la cápside y de la gp mediante el uso de colaboradores de la cápside y de la gp con secuencias de microARN objetivo no emparejadas e inhibidores. Las muestras se prepararon según se ha descrito en la Figura 7.

La Figura 9 es un gráfico que muestra los rendimientos de las VEE RP mediante el uso de colaboradores de la cápside y de la gp con secuencias de microARN objetivo no emparejadas e inhibidores. Las muestras se prepararon según se ha descrito en la Figura 7.

60 La Figura 10 es una inmunotransferencia Western de la expresión de la proteína de la cápside mediante el uso de colaboradores de la cápside que comprenden los miARN objetivo RC1-6 en la UTR en 5' del ARN colaborador de la cápside en ambos moldes de ARN de cadena positiva y de cadena negativa para la replicación, y en la UTR en 3' del molde de ARN de cadena negativa. Las combinaciones de ARN del replicón, ARM colaborador de la GP no modificado y uno de los miARN RC1-6 objetivo de los ARNs colaboradores de la cápside se electroporaron en células Vero en presencia y en ausencia de inhibidores de miARN específicos para el miARN

65

objetivo presente en los colaboradores de la cápside y de la gp en particular. Las células se sembraron en medio y se incubaron durante una noche. Después de la incubación (~ 18 horas), se recogieron las VEE RP. La ubicación del miARN objetivo en el colaborador de la cápside (UTR en 5' o en 3') y la polaridad del ARN (+ o -) están indicados en cada carril.

5 La Figura 11 es una inmunotransferencia Northern de la replicación del ARN de la cápside mediante el uso de colaboradores de la cápside con los miARN objetivo RC1-6 en la UTR en 5' del ARN del colaborador de la cápside en ambos moldes del ARN de cadena positiva y de cadena negativa para la replicación, y en la UTR en 3' del molde de ARN de cadena negativa. Las muestras se prepararon según se ha descrito en la Figura 10.

10 La Figura 12 es un gráfico que muestra los rendimientos de las VEE RP producidas mediante el uso de los diferentes miARN objetivo colaboradores de la cápside según se ha descrito en la Figura 10.

15 La Figura 13 es una inmunotransferencia Western de la expresión de la proteína de la cápside mediante el uso de colaboradores de la cápside que contienen seis copias de cada secuencia individual de miARN objetivo clonada en la UTR en 3' del ARN de cadena positiva del colaborador de la cápside. El ARN del colaborador de la cápside y el ARN del colaborador de la GP se combinaron sin modificar con el ARN del replicón y se electroporaron en células Vero en presencia o en ausencia de inhibidores del miARN específicos para el miARN objetivo presente en el colaborador de la cápside. Las células se sembraron en medio y se incubaron durante una noche. Después de la incubación (~ 18 horas), se recogieron las VEE RP.

20 La Figura 14 es una inmunotransferencia Northern de la replicación del ARN de la cápside mediante el uso de colaboradores de la cápside que contienen seis copias de cada secuencia individual de miARN objetivo clonada en la UTR en 3' del ARN de cadena positiva del colaborador de la cápside. Las muestras se recogieron según se ha descrito en la Figura 13.

La Figura 15 es un gráfico que muestra los rendimientos de las VEE RP producidas mediante el uso de los diferentes colaboradores de la cápside de miARN objetivo según se ha descrito en la Figura 13.

25 La Figura 16 es una inmunotransferencia Western de la expresión de la proteína de la cápside y de la gp mediante el uso de colaboradores de la cápside y de la gp construidos con una copia, con tres copias o con seis copias de la secuencia let-7 del miARN objetivo (también denominado en el presente documento miARN objetivo) modificadas en la UTR en 3' del ARN de cadena positiva. Los ARNs del colaborador de la cápside y de la gp, con el mismo número de copias de las secuencias del miARN objetivo, se combinaron con el ARN del replicón y se electroporaron en células Vero en presencia o en ausencia de inhibidores del miARN específicos para el miARN objetivo presente en los colaboradores. En un conjunto de las electroporaciones, el inhibidor específico para el oligonucleótido de ARN metilado en 2'-O de let-7 fue sustituido con un oligómero de fosforodiamidato morfolino (PMO) específico para el miARN de let-7. Las células se sembraron en medio y se incubaron durante una noche. Después de la incubación (~ 18 horas), se recogieron las VEE RP.

30 La Figura 17 es una inmunotransferencia Northern de la replicación del ARN de la cápside y de la gp mediante el uso de colaboradores de la cápside y de la gp construidos con una copia, con tres copias o con seis copias de la secuencia let-7 del miARN modificadas en la UTR en 3' del ARN de cadena positiva. Las muestras se recogieron según se ha descrito en la Figura 16.

La Figura 18 es un gráfico que muestra los rendimientos de las VEE RP producidas mediante el uso de los diferentes miARN objetivo colaboradores según se ha descrito en la Figura 16.

40 La Figura 19 es una inmunotransferencia Western de la expresión de la proteína de la cápside y de la gp mediante el uso de colaboradores de la cápside y de la gp construidos con una copia, con tres copias o con seis copias de la secuencia miR-17 del miARN objetivo (también denominada RC 5) modificadas en la UTR en 3' del ARN de cadena positiva. Los ARNs del colaborador de la cápside y de la gp, con el mismo número de copias que esta secuencia del miARN objetivo, se combinaron con el ARN del replicón y se electroporaron en células Vero en presencia o en ausencia de inhibidores del miARN específicos para el miARN objetivo presente en los colaboradores. Las células se sembraron en medio y se incubaron durante una noche. Después de la incubación (~ 18 horas), se recogieron las VEE RP.

45 La Figura 20 es una inmunotransferencia Northern de la replicación del ARN de la cápside y de la gp mediante el uso de colaboradores de la cápside y de la gp construidos con una copia, con tres copias o con seis copias de la secuencia mir-155 del miARN objetivo modificadas en la UTR en 3' del ARN de cadena positiva. Las muestras se recogieron según se ha descrito en la Figura 19.

La Figura 21 es un gráfico que muestra los rendimientos de las VEE RP producidas mediante el uso de los diferentes miARN objetivo colaboradores según se ha descrito en la Figura 19.

55 La Figura 22 es un gráfico de los resultados del análisis de ELISPOT específico para el HA de las preparaciones de VRP producidas y ensayadas en ratones BALB/c. Las combinaciones de los colaboradores de ambos miARN objetivo ("miCap", "miGP", "miCap + miGP") se mezclaron con vectores del replicón con el miARN objetivo no modificado ("WT") o modificado ("miREP") que expresan el gen de la gripe HA según se muestra en la Tabla 3. Se inmunizaron grupos de 16 ratones con dosis equivalentes de cada una de las VEE RP. Siete días después de la dosis de sensibilización, la mitad de los ratones (8) fueron sacrificados, se recogieron los esplenocitos y se llevó a cabo el análisis ELISPOT de interferón gamma específico para el HA.

60 La Figura 23 es un gráfico de los resultados del análisis de ELISPOT específico para el HA de las preparaciones de VRP preparadas como en la Figura 22 administradas a ratones BALB/c tres semanas después de la dosis de sensibilización, el resto de los ratones de cada grupo fueron revacunados con sus respectivas HA VRP. Siete días después de la revacunación, el resto de los animales fueron sacrificados y se recogieron los esplenocitos para un análisis ELISPOT de interferón gamma específico para el HA.

La Figura 24 es un gráfico del análisis de ELISA específico para el HA de muestras de suero obtenidas a partir de los ratones BALB/c inmunizados según se ha descrito en la Figura 22.

La Figura 25 es un gráfico del análisis de ELISA específico para el HA de muestras de suero obtenidas a partir de los ratones BALB/c inmunizados según se ha descrito en la Figura 23

5 La Figura 26 es un gráfico de los títulos de neutralización de las VEE RP determinados a partir de ratones vacunados con las VEE RP empaquetadas con diferentes combinaciones de colaboradores (véase la Tabla 6 para los detalles). Se recogieron muestras de suero de los ratones siete días después de la revacunación. El título para cada grupo de animales representa la media de la última dilución a la que el suero fue capaz de neutralizar el 80 % de una preparación de VEE RP que expresa proteína fluorescente verde.

10

Descripción detallada

[0012] En el presente documento se proporcionan métodos de aprovechamiento de la función reguladora del microARN, también denominado miARN, para controlar aspectos de la replicación de sistemas de vectores basados en virus (tales como sistemas colaboradores de replicón de alfavirus). Aunque la presente divulgación se centra en el ejemplo de los alfavirus, se contempla que puedan modificarse otros sistemas de vectores basados en virus, incluyendo, por ejemplo, sistemas de vectores de lentivirus, de herpesvirus y de adenovirus, según se describe en este documento para los alfavirus.

20 [0013] El género Alphavirus incluye diversos virus, todos los cuales son miembros de la familia Togaviridae. Los estudios con estos virus han dado lugar al desarrollo de técnicas de vacunación frente a las enfermedades por alfavirus y frente a otras enfermedades mediante el uso de vectores de alfavirus para la introducción de genes foráneos y también para aplicaciones de terapia génica. Una estrategia que implica a los vectores de alfavirus es la inserción de secuencias que codifican para antígenos inmunizantes de agentes patógenos en una cepa viva y replicante de un vector de un alfavirus. Otra estrategia es la utilización de un vector de un replicón para expresar los antígenos inmunizantes. Dichos vectores de replicón de alfavirus pueden ser empaquetados en partículas de replicón semejantes a alfavirus, denominadas en el presente documento ARPs, mediante el suministro de los genes de la proteína estructural *in trans*. Las proteínas estructurales pueden proporcionarse de varias formas. Las proteínas estructurales pueden ser proporcionadas por líneas celulares de empaquetamiento modificadas para que expresen las proteínas de una forma constitutiva o inducible (Polo y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 96 (8): 4598 - 603 (1999)). Las proteínas estructurales pueden ser expresadas de forma transitoria a partir de plásmidos de ADN bajo el control de un promotor de la polimerasa II, o puede ser proporcionadas en ARNs colaboradores que son replicados por el propio vector del replicón (Pushko y col., Virology 239 (2): 389 - 401 (1997); Rayner y col., Rev. Med. Virol. 12: 279 - 296 (2002)). Cada una de estas metodologías da finalmente como resultado la producción de los ARNs de las proteínas estructurales, y la traducción de estos ARNs en el citoplasma de la célula usada para el empaquetamiento del ARN del replicón. Se ha demostrado que pueden generarse alfavirus de replicación competente mediante el empaquetamiento conjunto de un ARN colaborador o de la recombinación de ARNs colaboradores con el ARN del replicón (Geigenmuller-Gnirke y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88 (8): 3253 - 7 (1991); Weiss y Schlesinger, J. Virol. 65 (8): 4017 - 25 (1991); Raju y col., J. Virol. 69 (12): 7391 - 401 (1995); y Hill y col., J. Virol. 71 (4): 2693 - 704 (1997)). Se describió un avance significativo en la reducción de la probabilidad de generar alfavirus de replicación competente cuando se separaron los genes de la proteína estructural en dos ARN colaboradores diferentes. Se requieren dos acontecimientos de recombinación por separado para reconstituir el genoma completo de un alfavirus cuando se usa un sistema de dos ARN colaboradores. La probabilidad de que se produzca este acontecimiento es significativamente menor que cuando se usa el sistema de un ARN colaborador (Pushko y col., Virology 239 (2): 389 - 401 (1997); Frolov y col., J. Virol. 71 (4): 2819 - 29 (1997); y Smerdou y Liljestrom, J. Virol. 73 (2): 1092 - 8 (1999)). Sin embargo, todavía hay predicciones teóricas para la aparición de alfavirus de replicación competente cuando se usa un sistema de dos ARN colaboradores, por ejemplo, existe la posibilidad de que los ARNs colaboradores puedan empaquetarse conjuntamente, incluso en ausencia de una señal de empaquetamiento definida en el ARN colaborador.

50

[0014] Los microARNs (miARN) son pequeños ARNs de aproximadamente 21 - 24 nucleótidos (nt) de longitud que han sido identificados en células y que están asociados con la regulación de la traducción y la estabilidad del ARNm. Se han identificado numerosos miARNs que controlan actividades celulares tales como la proliferación, la muerte celular, el metabolismo lipídico, los patrones neuronales en nematodos, la diferenciación hematopoyética y el desarrollo vegetal. Estos pequeños ARNs reguladores se han identificado en un amplio abanico de animales que incluyen mamíferos, peces, gusanos y moscas. Las secuencias de los miARN son transcritas a partir de genes de específicos para el miARN, en forma de unidades transcripcionales independientes, a lo largo de todo el genoma, o son producidos en coordinación con el procesamiento de intrones de ARNms específicos, combinando por tanto el control de la expresión de proteínas con el procesamiento del ARNm. La producción celular de miARNs comienza con la transcripción de grandes miARNs primarios precursores que son procesados por una enzima de tipo ribonucleasa III nuclear, Drosha. Los grandes ARNs precursores se denominan pri-miARNs y las especies más pequeñas procesadas por la Drosha, denominadas pre-miARNs, son exportadas desde el núcleo por la Exportina 5. El pre-miARN, exportado desde el núcleo, es procesado a continuación en el citoplasma por otra enzima de tipo ribonucleasa III, denominada Dicer, en un miARN maduro. El miARN maduro es transferido entonces al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) que guía al miARN hacia su ARN objetivo. Los 7 a 8 nucleótidos más en 5'

65

(específicamente, los nt 2 - 8) del miARN (denominada en ocasiones secuencia de siembra) están implicados en el apareamiento de bases de Watson-Crick con los nucleótidos de la región no traducida en 3' (UTR) del ARNm objetivo. Si el apareamiento de bases es perfecto, el ARNm objetivo es escindido por la actividad de endonucleasa del RISC. Alternativamente, si el apareamiento de bases es imperfecto, el ARNm objetivo se vuelve traduccionalmente inactivo y se efectúa la expresión de proteínas sin la degradación del ARNm.

[0015] En el presente documento se proporcionan sistemas colaboradores de alfavirus que usan elementos del miARN para dirigirse a los ARNs colaboradores en entornos en los que no están destinados a ser funcionales (tales como en un sujeto vacunado). El diseño del sistema requiere que la acción del miARN endógeno celular sobre su secuencia objetivo (presente en el ARN colaborador) esté ausente o inhibida en las células usadas para generar las VRP, pero activas (es decir, controlando la replicación del colaborador) en las células del sujeto. Es posible inhibir los miARNs celulares mediante el tratamiento de las células en las que se desea la función colaboradora (por ejemplo, líneas celulares de empaquetamiento, tales como Vero) con secuencias de ARN complementario específicas para el miARN de interés. Existen al menos 4 tipos de ARNs inhibidores que pueden usarse para inhibir los miARNs celulares, y uno o más de estos pueden ser introducidos en la célula según se proporciona en los métodos descritos en el presente documento. Algunos ARNs inhibidores incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos modificados (metilados en 2'-O- o en 2'-O-metoxietilo), ácidos nucleicos bloqueados (LNA; véase, por ejemplo, Valoczi y col., *Nucleic Acids Res.* 32 (22): e175 (2004)), oligonucleótidos de morfolino (véase, por ejemplo, Kloosterman y col., *PLoS Biol* 5 (8): e203 (2007)), ácidos nucleicos peptídicos (PNAs), conjugados de PNA-peptido, oligonucleótidos alternados metilados en LNA/2'-O- (véase, por ejemplo, Fabiani y Gait, *ARN* 14: 336 - 46 (2008)) y ARNms con múltiples copias del miARN objetivo modificadas en la UTR en 3', denominados en ocasiones esponjas de miARN. Los inhibidores de miARN funcionan secuestrando los miARNs celulares lejos de los ARNms que normalmente serían su objetivo. Según se describe en el presente documento, los inhibidores de miARN se añaden a las células en las que se producirán las VRP a partir de colaboradores del miARN objetivo y del ARN del replicón. Los inhibidores del miARN suprimen el control del miARN de la replicación del colaborador objetivo, permitiendo así la normal expresión estructural de las proteínas víricas a partir del (los) colaborador(es) y el empaquetamiento del ARN del replicón en las VRP. El uso de ARNs colaboradores con un miARN objetivo proporciona el control no sólo de los ARNs de los colaboradores empaquetados conjuntamente, sino también de los ARNs colaboradores que se han combinado con el ARN del replicón. Esto último podría llevarse a cabo porque, siempre que el miARN objetivo se mantenga después del acontecimiento de recombinación de replicón-colaborador, esta molécula de ADN recombinante todavía sería el objetivo para controlar a través de la ruta del ARNi descrita anteriormente.

[0016] En el presente documento se proporcionan métodos de aprovechamiento de la función reguladora del microARN para controlar aspectos de la replicación de vectores basados en virus o de sistemas de replicón, por ejemplo, vectores basados en alfavirus o sistemas de replicón. El género *Alphavirus* incluye diversos virus, todos los cuales son miembros de la familia *Togaviridae*. Según se usa en este documento, el término alfavirus incluye diversas especies, tales como, por ejemplo, el virus de la encefalitis equina oriental (EEE), el virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEE), el virus de los Everglades, el virus de Mucambo, el virus de Pixuna, el virus de la encefalitis equina occidental (WEE), el virus de Sindbis, el virus del bosque Semliki, el virus de Middleburg, el virus de Chikungunya, el virus de O'nyong-nyong, el virus de Ross River, el virus del bosque Barmah, el virus de Getah, el virus de Sagiyama, el virus de Bebaru, el virus de Mayaro, el virus de Una, el virus de Aura, el virus de Whataroa, el virus de Babanki, el virus de Kyzylgach, el virus de Highlands J, el virus de Fort Morgan, el virus de Ndumu y el virus de Buggy Creek. El genoma alfavírico es un ARN monocatenario de sentido mensajero, modificado en el extremo 5' con una protección metilada y en el extremo 3' con un tracto de poli (A) de longitud variable. Las subunidades estructurales contienen una única proteína vírica, la cápside, asociada con el genoma del ARN en una nucleocápside icosaédrica. En el virión, la cápside está rodeada por una cubierta lipídica recubierta con una matriz regular de espículas de la proteína transmembranal, cada una de las cuales consiste en un complejo heterodimérico de dos glucoproteínas, E1 y E2. Véase, por ejemplo, Pedersen y col., *J. Virol.* 14: 40 (1974). El virus de Sindbis y el virus del bosque de Semliki (SFV) están considerados como alfavirus prototipo y ha sido ampliamente estudiados. Véase Schlesinger, *The Togaviridae and Flaviviridae*, Plenum Publishing Corp., Nueva York (1986). El virus de la VEE ha sido ampliamente estudiado, véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.185.440 y las referencias mencionadas en la misma. Los alfavirus útiles en los constructos y métodos proporcionados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, el VEE, el S.A. AR86, el Sindbis (por ejemplo, TR339, véase la Patente de EE.UU. N° 6.008.035) y el SFV.

[0017] Se han descrito sistemas de vectores o replicones de alfavirus. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.185.440 a favor de Davis y col., la Publicación Internacional N° WO 92/10578; las Patentes de EE.UU. N°s 5.505.947 y 5.643.576 a favor de Johnston y col.; Hahn y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89: 2679 - 83 (1992); la Patente de EE.UU. N° 6.190.666 a favor de Garoff y col.; las Patentes de EE.UU. N°s 5.792.462; 6.156.558; 6.521.235; 6.531.135; 6.541.010 y 7.235.235 a favor de Johnston y col.; las Patentes de EE.UU. N°s 7.045.335 y 7.078.218 a favor de Smith y col.; las patentes de EE.UU. N°s 5.814.482; 5.843.723; 5.789.245; 6.015.694; 6.105.686 y 6.376.236 a favor de Dubensky y col.; la Publicación de Patente de EE.UU. N° 2002-0015945 de Polo y col.; la Publicación de Patente de EE.UU. N° 2001-0016199 de Johnston y col.; la Publicación de Patente de EE.UU. N° 2005-0266550 de Rayner y col.; Frolov y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93: 11371 - 7 (1996); Pushko y col., *Virology* 239: 389 - 401 (1997); Polo y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 96 (8): 4598 - 603 (1999); Rayner y col.,

Rev. Med. Virol. 12: 279 - 96 (2002); Geigenmuller-Gnirke y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88 (8): 3253 - 7 (1991); Weiss y Schlesinger, J. Virol. 65 (8): 4017 - 25 (1991); Raju y col., J. Virol. 69 (12): 7391 - 401 (1995); Hill y col., J. Virol. 71 (4): 2693 - 704 (1997); Frolov y col., J. Virol. 71 (4): 2819 - 29 (1997); y Smerdou y Liljestrom, J. Virol. 73 (2): 1092 - 8 (1999). Dichos sistemas de replicón incluyen uno o más ácidos nucleicos colaboradores y uno o más replicones. Como un ejemplo, se incorporan secuencias del miARN objetivo endógeno celular en 1) ARNs colaboradores de la cápside, 2) ARNs colaboradores de la glucoproteína 3) o ARNs del vector del replicón. Los miARNs endógenos celulares naturales inhiben significativamente la capacidad de los ácidos nucleicos colaboradores que contienen la secuencia objetivo para replicarse *in vitro* e *in vivo*. El uso de secuencias objetivo del miARN endógeno celular que son específicas de tejido y/o específicas de la etapa de desarrollo en los ARNs del vector del replicón, proporciona un control sobre la expresión del replicón únicamente en los tejidos o en las etapas que se desee. Según se usa en este documento, la frase microARN o miARN endógeno celular se refiere a un microARN codificado por una célula de un organismo distinto a un virus. El organismo puede ser unicelular o pluricelular. Por lo tanto, el microARN puede estar codificado por una célula de un procarionta o de un eucariota. Por lo tanto, el microARN puede estar codificado por una célula de un animal, tal como, por ejemplo, un mamífero o un ser humano.

[0018] En el presente documento se proporcionan ácidos nucleicos colaboradores que comprenden una secuencia de reconocimiento en 5' de un alfavirus; una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una proteína estructural de un alfavirus; una secuencia de reconocimiento de la replicación en 3' de un alfavirus; y al menos una secuencia de un microARN objetivo de un microARN endógeno celular. Opcionalmente, los ácidos nucleicos colaboradores pueden comprender al menos una secuencia de un microARN objetivo de un microARN endógeno celular y una secuencia de un ácido nucleico que codifica para una proteína estructural del alfavirus, en la que la secuencia de un microARN objetivo está ubicada en una región del ácido nucleico que codifica para la proteína estructural del alfavirus. Una región del ácido nucleico que codifica para la proteína estructural del alfavirus puede incluir, por ejemplo, la región traducida o no traducida (UTR) (por ejemplo, una UTR en 3' o en 5') del ácido nucleico. Los términos colaborador(es) del alfavirus, ácido(s) nucleico(s) colaborador(es) del alfavirus o constructo(s) colaborador(es) del alfavirus, se refieren a una(s) molécula(s) de ácido(s) nucleico(s) que es (son) capaz(es) de expresar una o más proteínas estructurales del alfavirus. Smith y col. (Publicación de Patente Internacional WO 2004/085660), Smith y col. (Patente de EE.UU. N° 7.045.335) y Kamrud y col. (Publicación de Patente de EE.UU. N° 2009-0075384) describen numerosos constructos colaboradores útiles para la expresión de las proteínas estructurales de alfavirus en la producción de ARPs.

[0019] Los términos secuencia de reconocimiento de la replicación del alfavirus en 5' y reconocimiento de la replicación del alfavirus en 3' se refieren a las secuencias de ARN que se encuentran en los alfavirus, a las secuencias derivadas de los mismos o a secuencia sintéticas basadas en las secuencias conservadas entre los distintos alfavirus, que son reconocidas por las proteínas replicasa no estructurales de los alfavirus y que dan lugar a la replicación del ARN vírico. Estas secuencias pueden estar, por ejemplo, en forma de un ADN para facilitar la preparación, la mutación y/o la manipulación de los ácidos nucleicos colaboradores descritos en el presente documento. El uso de secuencias de reconocimiento de la replicación en 5' y en 3' dan como resultado la replicación y/o la transcripción de la secuencia de ARN codificada entre las dos secuencias.

[0020] La secuencia de un microARN objetivo del ácido nucleico colaborador está ubicada, por ejemplo, en la región traducida, en la UTR en 5' o en la UTR en 3' del ácido nucleico que codifica para la proteína estructural del alfavirus. Opcionalmente, hay múltiples microARN objetivo ubicados en diferentes ubicaciones del ácido nucleico; por ejemplo, al menos una secuencia objetivo está ubicada en la UTR en 3' del ácido nucleico que codifica para la proteína estructural del alfavirus y al menos una secuencia objetivo está ubicada en la UTR en 5' del ácido nucleico que codifica para la proteína estructural del alfavirus. Cuando está ubicada en la región traducida del ácido nucleico colaborador, los microARN objetivo están diseñados opcionalmente para estar en marco y para codificar aminoácidos. Sin embargo, los aminoácidos adicionales no afectan significativamente al nivel de expresión de la proteína o a su función. Por ejemplo, los microARN objetivo pueden insertarse en la secuencia líder de la proteína estructural. En el caso de un alfavirus, los microARN objetivo pueden insertarse en la secuencia conocida como "E3" (véase a continuación). Previamente se ha demostrado que pueden insertarse aminoácidos adicionales en E3 sin un efecto perjudicial (véase, por ejemplo, London y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 207 - 11 (1992)). Opcionalmente, puede alterarse la secuencia de la región traducida de la proteína estructural del alfavirus para crear una secuencia de un microARN objetivo sin modificar el número o el contenido de aminoácidos de la proteína. Por ejemplo, podrían realizarse sustituciones conservativas en la secuencia de nucleótidos de la proteína estructural del alfavirus mediante el uso de la redundancia de las asignaciones de codones sin alterar el aminoácido codificado por el codón. Opcionalmente, el ácido nucleico colaborador comprende dos o más secuencias del microARN objetivo. Por lo tanto, el ácido nucleico colaborador puede comprender dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más secuencias objetivo de microARN. Opcionalmente, el ácido nucleico colaborador comprende entre 1 y 10, entre 1 y 20, entre 1 y 30, entre 5 y 10, entre 5 y 20, entre 5 y 30, entre 10 y 20, entre 10 y 30 o entre 15 y 30 secuencias del microARN objetivo. Opcionalmente, la secuencia de un microARN objetivo tiene una complementariedad del 100 % con el microARN endógeno celular. Alternativamente, la secuencia de un microARN objetivo tiene una complementariedad menor del 100 % con el microARN endógeno celular. Un porcentaje de complementariedad indica el porcentaje de residuos de una molécula de un ácido nucleico que puede formar enlaces de hidrógeno (por

ejemplo, apareamiento de bases de Watson-Crick) con una segunda secuencia de un ácido nucleico (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de un total de 10 nucleótidos del primer oligonucleótido con apareamiento de bases con una segunda secuencia de un ácido nucleico con 10 nucleótidos representa un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 % y un 100 % de complementariedad, respectivamente). Un 100 % de complementariedad significa que todos los
 5 residuos de una secuencia de un ácido nucleico secuencia formaran puentes de hidrógeno con el mismo número de residuos de una segunda secuencia de un ácido nucleico. Por lo tanto, la secuencia de un microARN objetivo tiene una complementariedad del 100 %, del 95 %, del 90 %, del 85 %, del 80 %, del 75 %, del 70 %, o cualquier porcentaje de complementariedad entre el 100 % y el 70 %, con el microARN endógeno celular. Opcionalmente, una porción de la secuencia de un microARN objetivo, por ejemplo, los 8 nucleótidos en 5', que a menudo se conoce
 10 como la secuencia de "siembra", es idéntica (es decir, tiene una complementariedad del 100 %) al microARN endógeno celular, mientras que una segunda porción de la secuencia de un microARN objetivo tiene una complementariedad menor del 100 %, por ejemplo, del 50 %, con el microARN endógeno celular. Opcionalmente, el tamaño de la secuencia de un microARN objetivo es de entre 5 y 10, de entre 5 y 20, de entre 5 y 30, de entre 5 y 40, de entre 5 y 50, de entre 10 y 20, de entre 10 y 30, de entre 10 y 40, de entre 10 y 50, de entre 15 y 20, de entre
 15 15 y 30, de entre 15 y 40, de entre 15 y 50, de entre 20 y 25, de entre 20 y 30, de entre 20 y 40, de entre 20 y 50, de entre 25 y 30, de entre 25 y 40 o de entre 25 y 50 nucleótidos.

[0021] Como se ha analizado anteriormente, el ácido nucleico colaborador comprende una o más proteínas estructurales del alfavirus. Por lo tanto, el ácido nucleico colaborador comprende una o más de una proteína
 20 estructural del alfavirus. Según se usa en este documento, los términos proteína / proteína(s) estructural(es) del alfavirus se refieren a una o a una combinación de las proteínas estructurales codificadas por los alfavirus. Por ejemplo, la proteína estructural del alfavirus es una proteína estructura del virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEE). A modo de otro ejemplo, la proteína estructural del alfavirus se elige de entre el grupo que consiste las proteínas estructurales del Arbovirus surafricano N° 86, del virus de Sindbis, del virus del bosque de Semliki y del virus de Ross River Virus. Las proteínas estructurales de los Alphavirus son producidas por el alfavirus
 25 en forma de una poliproteína y generalmente están representadas en la bibliografía como C-E3-E2-6k-E1. La E3 y la 6k sirven como señales de translocación de membrana / transporte para las dos glucoproteínas, E2 y E1. Por lo tanto, el uso del término E1 en el presente documento puede referirse a la E1, a la E3-E1, a la 6k-E1 o a la E3-6k-E1, y el uso del término E2 en el presente documento puede referirse a la E2, a la E3-E2, a la 6k-E2 o a la E3-6k-E2.
 30 Normalmente, las proteínas estructurales del alfavirus incluyen la proteína de la cápside, la glucoproteína E1 y la glucoproteína E2 del alfavirus maduro (algunos alfavirus, tales como el virus del bosque de Semliki, contienen una proteína adicional, la E3, en la cubierta madura). Por lo tanto, como un ejemplo, el ácido nucleico colaborador comprende una proteína de la cápside del alfavirus. Opcionalmente, la proteína de la cápside del alfavirus es una proteína de la cápside del VEE. Como otro ejemplo, el ácido nucleico colaborador comprende una glucoproteína de
 35 un alfavirus. Opcionalmente, la glucoproteína del alfavirus es una glucoproteína del VEE. Una glucoproteína, como se denomina en el presente documento, puede estar codificada por una secuencia de un ácido nucleico que comprende un único marco abierto de lectura (orf) que codifica para la E3-E2-6k-E1, un orf que codifica para la E3-E2, un orf que codifica para la 6k-E1, un orf que codifica para la E3-E1, un orf que codifica para la E3-6k-E1, un orf que codifica para la 6k-E2 o un orf que codifica para la E3-6k-E2.
 40

[0022] Las proteínas estructurales del alfavirus están distribuidas entre una o más moléculas de un ácido nucleico colaborador (por ejemplo, un primer ARN (o ADN) colaborador y un segundo ARN (o ADN) colaborador). La misma proteína estructural puede estar codificada por más de un ácido nucleico colaborador. Los ácidos nucleicos colaboradores codifican para al menos una, pero no todas, las proteínas estructurales del alfavirus, y un segundo
 45 ácido nucleico colaborador codifica para al menos una proteína estructural del alfavirus que no está codificada por un primer ácido nucleico colaborador. Además, una o más proteínas estructurales pueden estar ubicadas en la misma molécula que el ácido nucleico del replicón, con la condición de que al menos una proteína estructural del alfavirus no esté ubicada en el ARN del replicón, de forma que el replicón y la partícula de alfavirus resultante tengan una propagación defectuosa. Según se usa en este documento, el término no ubicado en significa la ausencia total
 50 del segmento especificado o la ausencia total de una porción suficiente del segmento especificado como para hacer que el segmento sea inoperante o no funcional, de acuerdo con el uso estándar. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 4.650.764 a favor de Temin y col. El término replicación defectuosa, según se usa en el presente documento, es sinónimo de propagación defectuosa, y significa que las partículas que entran en contacto con una célula hospedadora dada no pueden producir partículas de progenie en la célula hospedadora, debido a la ausencia
 55 de la función colaboradora, es decir, de las proteínas estructurales del alfavirus requeridas para el empaquetamiento del ácido nucleico del replicón. Sin embargo, el ácido nucleico del replicón es capaz de autorreplicarse y de ser expresado en la célula hospedadora en la que ha sido introducido.

[0023] En todos los ácidos nucleicos colaboradores descritos en el presente documento, se entiende que estas
 60 moléculas comprenden adicionalmente las secuencias necesarias para su expresión (que engloban las señales para la traducción y, cuando sea apropiado, la transcripción o la replicación) de las secuencias de las proteínas estructurales codificadas en las células colaboradoras. Dichas secuencias pueden incluir, por ejemplo, promotores, (ya sean víricos, procariotas o eucariotas, inducibles o constitutivos), elementos de IRES y secuencias de reconocimiento para la replicasa vírica en 5' y en 3'. Opcionalmente, uno o más ácidos nucleicos colaboradores
 65 pueden incluir únicamente las secuencias de reconocimiento para la replicación vírica en 5' y en 3' (véase Kamrud y

col., Publicación de Patente de EE.UU. N° 2009-0075384), funcionando así directamente como ARNm replicables cuando son introducidos en una célula eucariota. En el caso de ácidos nucleicos colaboradores que expresan una o más glucoproteínas, se entiende que estas secuencias son expresadas ventajosamente con una secuencia líder o de señalización en el N-terminal de la región codificante de la proteína estructural en los constructos de ácidos nucleicos. La secuencia líder o de señalización deriva del alfavirus, por ejemplo, E3 o 6k, o es una secuencia heteróloga, tal como el péptido de señalización del activador del plasminógeno tisular, o una secuencia sintética. Por lo tanto, como un ejemplo, un primer ácido nucleico colaborador puede ser una molécula de ARN que codifica para la E3-E1 de la cápside, y el segundo ácido nucleico colaborador puede ser una molécula de ARN que codifica para la E3-E2 de la cápside. Alternativamente, el primer ARN colaborador puede codificar sólo para la cápside, y el segundo ARN colaborador puede codificar para la E3-E2-6k-E1. Adicionalmente, las señales de empaquetamiento o secuencias de encapsidación que pueden estar presentes en el genoma vírico opcionalmente no están presentes en todos los ácidos nucleicos colaboradores. Por lo tanto, opcionalmente, la(s) señal(es) de empaquetamiento no está(n) ubicada(s) en todos los ácidos nucleicos colaboradores.

15 **[0024]** Los ácidos nucleicos colaboradores descritos en el presente documento pueden ser introducidos en células de empaquetamiento, es decir, aquellas células en las que un replicón es empaquetado por las proteínas estructurales expresadas a partir de los colaboradores, de varias formas. Pueden ser expresados a partir de uno o más casetes de expresión que han sido transformados de forma estable en las células, estableciendo así las líneas celulares de empaquetamiento (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 6.242.259). Alternativamente, el ácido nucleico colaborador es incorporado en el genoma de la célula de empaquetamiento antes de la introducción / expresión del vector del replicón de ARN. Opcionalmente, el ácido nucleico colaborador contiene un promotor inducible tal que la expresión de las proteínas estructurales es inducida con el estímulo apropiado justo antes, o junto con, o después de, la introducción del vector del replicón de ARN.

25 **[0025]** Alternativamente, los ARNs puede ser introducidos como moléculas de ARN o de ADN que pueden ser expresadas en la célula colaboradora sin su integración en el genoma de la célula. Algunos métodos de introducción incluyen electroporación, vectores víricos (por ejemplo, SV40, adenovirus, nodavirus, astrovirus) y transfección mediada por lípidos.

30 **[0026]** Una alternativa a múltiples ARNs colaboradores es el uso de una única molécula de ADN, que codifica para todos los polipéptidos necesarios para el empaquetamiento del ARN del replicón vírico en partículas de replicón de alfavirus infecciosas (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 7.045.335). Por lo tanto, como un ejemplo, el ácido nucleico colaborador es un ARN. Como otro ejemplo, el ácido nucleico colaborador es un ADN. El único ADN colaborador es introducido en la célula de empaquetamiento mediante cualquier medio conocido que incluye, pero no se limita a, electroporación, transfección mediada por lípidos (lipofección), un vector vírico (por ejemplo, adenovirus o SV-40) o transfección mediada por fosfato de calcio. El ADN es normalmente electroporado en las células con una disminución en el voltaje y un aumento en la capacitancia, en comparación con los requeridos para la captación del ARN. Por lo tanto, las condiciones para la electroporación del ADN en las células pueden diferir de las requeridas para la captación del ARN, pero pueden ser determinadas mediante una experimentación rutinaria. En todas las electroporaciones, el valor del voltaje y de la capacitancia debe ser establecido de forma que se evite la destrucción de la capacidad de las células de empaquetamiento (hospedadoras) de producir partículas infecciosas de virus.

45 **[0027]** Según se proporciona en el presente documento y se analiza con más detalle a continuación, los ácidos nucleicos colaboradores se usan junto con un replicón para producir alfavirus o partículas de replicón semejantes a alfavirus. Los términos partículas de replicón semejantes a alfavirus (ARPs), o partículas de alfavirus recombinantes, usados de forma intercambiable en el presente documento, significan un complejo estructural de tipo virión que incorpora un ARN de un replicón de un alfavirus. El replicón expresa opcionalmente una o más secuencias heterólogas de ARN. Opcionalmente, el complejo estructural de tipo virión incluye una o más proteínas estructurales del alfavirus incluidas en una cubierta lipídica que encierra una nucleocápside que, a su vez, encierra el ARN. La cubierta lipídica deriva normalmente de la membrana plasmática de la célula en la que son producidas las partículas. Opcionalmente, el ARN de un replicón de un alfavirus está rodeado por una estructura de nucleocápside formada por la proteína de la cápside del alfavirus, y las lipoproteínas del alfavirus están incluidas en la cubierta lipídica derivada de la célula. Las proteínas estructurales y el ARN del replicón pueden derivar del mismo o de diferentes alfavirus. Por ejemplo, el ARN del replicón y las proteínas estructurales son del VEE, véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE.UU. 2005-0266550 de Smith y col. Opcionalmente, el ARN del replicón deriva del VEE y las proteínas estructurales derivan del virus de Sindbis (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 6.376.236 a favor de Dubensky y col.). Las partículas del replicón del alfavirus son infecciosas pero de propagación defectuosa, es decir, el ARN del replicón no puede propagarse más allá de la célula hospedadora a la que han infectado inicialmente las partículas, en ausencia del (los) ácido(s) nucleico(s) colaborador(es) que codifica(n) para las proteínas estructurales del alfavirus.

65 **[0028]** Por lo tanto, se proporciona una población de partículas de replicón semejantes a alfavirus (ARP) que comprende (i) un primer subconjunto de partículas que comprende un replicón y (ii) un segundo subconjunto de partículas que comprende uno o más ácidos nucleicos colaboradores según se describe en este documento que

comprenden una o más secuencias del miARN objetivo, o un fragmento de las mismas, y un replicón. Opcionalmente, las ARPs derivan del virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEE), del Arbovirus surafricano N° 86, del virus de Sindbis, del virus del bosque de Semliki o del virus de Ross River. Opcionalmente, como se analizará a continuación, el replicón codifica para un polipéptido, para un polipéptido inmunoestimulante, para un polipéptido inmunógeno o para un producto terapéutico. Una población de partículas de replicón de alfavirus proporcionada en el presente documento no contiene partículas de virus de replicación competente detectables, según se determina mediante su paso en células permisivas en cultivo. Opcionalmente, la población de partículas de replicón de alfavirus contiene una o más mutaciones atenuantes bien en una proteína estructural del alfavirus o bien en una proteína no estructural del alfavirus, o tanto en una proteína estructural del alfavirus como en una proteína no estructural del alfavirus.

[0029] Los términos replicón del ARN del alfavirus, replicón, ARN de replicón, ARN de un replicón de un alfavirus, replicón de un vector de ARN de un alfavirus, se usan de forma intercambiable para referirse a una molécula de ARN que expresa polipéptidos no estructurales de forma que puede dirigir su propia replicación (amplificación) y comprende, como mínimo, las secuencias de reconocimiento de la replicación vírica en 5' y en 3' (por ejemplo, las secuencias de reconocimiento de la replicación en 5' y en 3' de un alfavirus), las secuencias codificantes para proteínas víricas no estructurales (por ejemplo, las proteínas no estructurales de un alfavirus) y un tracto de poliadenilación. Según se usa en este documento, los términos secuencia de reconocimiento de la replicación en 5' de un alfavirus y secuencia de reconocimiento de la replicación en 3' de un alfavirus se refieren a las secuencias encontradas en alfavirus, o a las secuencias derivadas de los mismos, que son reconocidas por las proteínas replicasa no estructurales del alfavirus y dan lugar a la replicación del ARN vírico. Estos a menudo se conocen como los extremos 5' y 3', o las secuencias en 5' y en 3', del alfavirus. Estas secuencias pueden ser modificadas mediante técnicas de biología molecular estándar, véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE.UU. N° 2007-0166820 y la Publicación de Patente de EE.UU. N° 2009-0075384) para minimizar adicionalmente el potencial de recombinación o para introducir sitios de clonación, con la condición de que deben ser reconocidas por la maquinaria de replicación del alfavirus. Además, el replicón contiene opcionalmente uno o más elementos para dirigir la expresión, lo que significa la transcripción y la traducción, de una secuencia de ARN heteróloga. Opcionalmente se modifica para que expresen las proteínas estructurales del alfavirus. Por ejemplo, Smith y col. (Publicación Internacional WO 2004/085660) y Smith y col. (Patente de EE.UU. N° 7.045.335) describen numerosos constructos para dichos replicones de ARN de alfavirus.

[0030] El replicón de ARN de alfavirus proporcionado en el presente documento está diseñado para expresar una o más secuencias heterólogas o ARNs funcionales de interés, también denominados en el presente documento ARN heterólogo o secuencia heteróloga, que pueden elegirse de entre una gran diversidad de secuencias derivadas de virus, procariotas o eucariotas, incluyendo proteínas péptidos, epítopos o fragmentos inmunógenos antigénicos naturales, modificados o sintéticos. Por lo tanto, el replicón puede codificar para un polipéptido. Algunos polipéptidos incluyen, por ejemplo, moléculas inmunoestimulantes. Algunos polipéptidos inmunoestimulantes incluyen, por ejemplo, la IL-12. Opcionalmente, el replicón codifica para un polipéptido inmunógeno. Algunos polipéptidos inmunógenos incluyen, por ejemplo, polipéptidos inmunógenos derivados de células cancerosas, de células tumorales, de toxinas o de un agente infeccioso. Algunos agentes infecciosos incluyen, por ejemplo, virus, bacterias, hongos y parásitos. Según se usa en este documento, un polipéptido inmunógeno, un péptido inmunógeno o un inmunógeno incluye cualquier péptido, proteína o polipéptido que desencadene una respuesta inmunitaria en un sujeto. Opcionalmente, el polipéptido inmunógeno es adecuado para proporcionar un cierto grado de protección a un sujeto frente a una enfermedad. Estos términos pueden usarse de forma intercambiable con el término antígeno. Opcionalmente, el polipéptido inmunógeno puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en, uno o más epítopos. Según se usa en este documento, un epítipo es un conjunto de residuos de aminoácidos que está implicado en el reconocimiento por parte de una inmunoglobulina o de un fragmento de inmunoglobulina en particular.

[0031] Opcionalmente, el replicón codifica para un producto terapéutico, tal como, por ejemplo, una proteína terapéutica o un ácido nucleico o inhibidor. Un ácido nucleico inhibidor incluye una molécula antisentido, un oligonucleótido formador de triplex, una secuencia de guía externa, un aptámero, un siARN, un miARN, un shARN y una ribozima.

[0032] Opcionalmente, el replicón no expresa un polipéptido ni un producto terapéutico. Dicho replicón "vacío" puede ser empaquetado en una VRP y usado como coadyuvante para potenciar la inmunogenicidad de otros productos, incluyendo otras VRPs.

[0033] Según se usa en este documento, una expresión dirigida por una secuencia en particular es la transcripción de una secuencia asociada secuencia abajo. Si es apropiado o si se desea para la secuencia asociada, entonces el término expresión incluye también la traducción (síntesis de proteínas) del ARN transcrito o introducido. Opcionalmente, la transcripción y la traducción del replicón, de los ARNs heterólogos y de los ARNs colaboradores están controladas individualmente por diferentes elementos reguladores. Opcionalmente, el control de la expresión del ácido nucleico a nivel de la traducción es llevado a cabo mediante la introducción de un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) secuencia abajo del promotor, por ejemplo, el promotor subgenómico del alfavirus 26S, y

secuencia arriba de la secuencia codificante, por ejemplo, para la secuencia heteróloga o para una proteína estructural del alfavirus, que va a ser traducida. Esto puede denominarse casete del promotor subgenómico-IRES-ácido nucleico heterólogo de interés (NOI). Opcionalmente, se incorpora una secuencia separadora entre el promotor subgenómico del alfavirus 26S y el elemento IRES. Las secuencia separadora proporciona una separación 5 óptima entre estos dos elementos para mejorar la traducción a partir del IRES. El elemento IRES está posicionado de forma que dirige la traducción del ARNm, minimizando, limitando o evitando así el inicio de la traducción del ARNm a partir de la estructura de metil-7-guanosina (5')pppN presente en el extremo 5' del ARNm subgenómico (el "protegido"). Dicha traducción dirigida por el IRES se denomina en ocasiones traducción "independiente de la protección". Estos constructos dan como resultado una traducción controlada por el IRES de una secuencia 10 heteróloga independientemente de la transcripción guiada por el promotor (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 7.442.381 a favor de Smith y col.). Pueden emplearse elementos IRES procedentes de muchas fuentes diferentes, incluyendo elementos IRES víricos procedentes de picornaviruses, por ejemplo, de poliovirus (PV) o del enterovirus 71 humano, por ejemplo, las cepas 7423/MS/87 y BrCr de los mismos; a partir del virus de la encefalomiocarditis (EMCV); a partir del virus de la glosopeda (FMDV); a partir de flavivirus, por ejemplo, del virus de la hepatitis C (HCV); a partir de pestivirus, por ejemplo, del virus de la fiebre porcina clásica (CSFV); a partir de 15 retrovirus, por ejemplo, del virus de la leucemia murina (MLV); a partir de lentivirus, por ejemplo, el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV); a partir de elementos IRES del ARNm celular tales como a partir de factores de inicio de la traducción, por ejemplo, eIF4G o DAP5; a partir de factores de transcripción, por ejemplo, c-Myc o el factor represor de NF-κB (NRF); a partir de factores de crecimiento, por ejemplo, del factor de crecimiento endotelial 20 vascular (VEGF), del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) y del factor de crecimiento derivado de plaquetas B (PDGF B); a partir de genes homeóticos, por ejemplo, de Antennapedia; a partir de proteínas de supervivencia, por ejemplo, inhibidor de la apoptosis ligado a X (XIAP) o de Apaf-1 ; a partir de chaperonas, por ejemplo, de la proteína BiP de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina, de virus vegetales, así como de cualquier otro elemento IRES. El término transcripción según se usa en el presente documento incluye la producción del ARN a 25 partir de un replicón recombinante o de un ácido nucleico colaborador, que puede ser por sí mismo una molécula de ARN.

[0034] Opcionalmente, pueden emplearse colaboradores sin promotor. Dichas moléculas colaboradoras no contienen un promotor; en su lugar, son introducidos como ARNs replicables que comprenden secuencias de 30 reconocimiento de la replicación en 5' y en 3'. La traducción de ácidos nucleicos colaboradores sin promotor se produce a través de la protección en 5' de la molécula de ARN. Opcionalmente, en ausencia de algún elemento promotor del ácido nucleico colaborador, puede incluirse un elemento IRES para que dirija la traducción.

[0035] Opcionalmente, uno o más de los ácidos nucleicos que codifican para las proteínas estructurales del 35 alfavirus, es decir, la cápside, la glucoproteína E1 y la glucoproteína E2, o el constructo del replicón, contienen una o más mutaciones atenuantes. Una mutación atenuante se refiere a una deleción, una adición o una sustitución de un nucleótido por uno o más nucleótidos, o a una mutación que comprende el reordenamiento de un constructo quimérico que da como resultado una pérdida de virulencia en un virus vivo que contiene la mutación con respecto al apropiado virus natural. Las frases mutación atenuante y aminoácido atenuante, según se usan en el presente 40 documento, también significan una mutación de nucleótido que puede estar o no en una región del genoma vírico que codifica para los polipéptidos o para un aminoácido codificado por una mutación del nucleótido. En el contexto de un virus vivo, las mutaciones atenuantes dan como resultado una disminución en la probabilidad de que el alfavirus provoque una enfermedad en su hospedador (es decir, una pérdida de virulencia), de acuerdo con la terminología estándar, tanto si la mutación es una mutación por sustitución o una mutación por deleción o adición en 45 marco. Véase, por ejemplo, Davis y col., *Microbiology*, 4ª Ed., 156 - 158 (1990). La expresión mutación atenuante excluye las mutaciones que serían letales para el virus, salvo que dicha mutación se use junto con una mutación de restauración que vuelva al virus viable, aunque atenuado. Se conocen los métodos para la identificación de las mutaciones atenuantes adecuadas en el genoma de los alfavirus. Olmsted y col., describen un método para la identificación de mutaciones atenuantes en el virus de Sindbis mediante la selección de crecimiento rápido en cultivo 50 celular (Olmsted y col., *Science* 225: 424 (1984)). Johnston y Smith, describen la identificación de mutaciones atenuantes en el VEE mediante la aplicación de una presión selectiva directa para la penetración acelerada de células BHK (Johnston y Smith, *Virology* 162: 437 (1988)). Se han descrito en la técnica mutaciones atenuantes en alfavirus, por ejemplo, White y col., *J. Virology* 75: 3706 (2001); Kinney y col., *Virology* 70: 19 (1989); Heise y col., *J. Virology* 74: 4207 (2000); Bernard y col., *Virology* 276: 93 (2000); Smith y col., *J. Virology* 75: 11196 (2001); Heidner 55 y Johnston, *J. Virology* 68: 8064 (1994); Klimstra y col., *J. Virology* 73: 10387 (1999); Glasgow y col., *Virology* 185: 741 (1991); Polo y Johnston, *J. Virology* 64: 4438 (1990); y Smerdou y Liljestrom, *J. Virology* 73: 1092 (1999).

[0036] Las mutaciones atenuantes apropiadas dependen del alfavirus usado. Por ejemplo, cuando el alfavirus es el VEE, las mutaciones atenuantes adecuadas incluyen aquellas elegidas de entre el grupo que consiste en los 60 codones en la posición del aminoácido 76 de la E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina, arginina o histidina, como el aminoácido 76 de la E2; los codones en la posición del aminoácido 120 de la E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina, como el aminoácido 120 de la E2; los codones en la posición del aminoácido 209 de la E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina, arginina, o histidina, como el aminoácido 209 de la E2; los codones en la posición del aminoácido de 272 de la E1 que 65 especifican una mutación atenuante, preferiblemente treonina o serina, como el aminoácido de 272 de la E1; los

codones en la posición del aminoácido 81 de la E1 que especifican una mutación atenuante, preferiblemente isoleucina o leucina, como el aminoácido de 81 de la E1; y los codones en la posición del aminoácido de 253 de la E1 que especifican una mutación atenuante, preferiblemente serina o treonina, como el aminoácido de 253 de la E1. Algunas mutaciones atenuantes adicionales incluyen mutaciones por delección o por sustitución en el dominio de escisión entre la E3 y la E2 tal que la poliproteína E3/E2 no es escindida; esta mutación, junto con la mutación en E1-253, es una cepa atenuada preferida para su uso en esta invención. De forma similar, las mutaciones presentes en cepas de vacunas existentes de virus vivos, por ejemplo, la cepa TC83 (véase, por ejemplo, Kinney y col., Virology 170: 19 - 30 (1989), particularmente la mutación en el nucleótido 3), también pueden emplearse opcionalmente en las partículas creadas mediante los métodos proporcionados.

10

[0037] Cuando el alfavirus es el Arbovirus surafricano N° 86 (S.A. AR86), algunas mutaciones atenuantes adecuadas incluyen aquellas elegidas de entre el grupo que consiste en los codones en la posición del aminoácido 538 de la nsP11 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente isoleucina, como el aminoácido 538 de la nsP11; los codones en la posición del aminoácido 304 de la E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente treonina, como el aminoácido en la posición 304 de la E2; los codones en la posición del aminoácido 314 de la E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina, como el aminoácido 314 de la E2; los codones en la posición del aminoácido 376 de la E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente alanina, como el aminoácido 376 de la E2; los codones en la posición del aminoácido 372 de la E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente leucina, como el aminoácido 372 de la E2; los codones en la posición del aminoácido 96 de la nsP12 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente glicina, como el aminoácido de 96 de la nsP12; y los codones en la posición del aminoácido de 372 de la nsP12 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente valina, como el aminoácido 372 de la nsP12. Algunas mutaciones atenuantes adecuadas en las que se emplean otros alfavirus son conocidas por los expertos en la técnica.

15

20

[0038] Las mutaciones atenuantes se introducen en el ARN llevando a cabo una mutagénesis dirigida sobre el ADNc que codifica para el ARN, de acuerdo con procedimientos conocidos. Véase, por ejemplo, Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82: 488 (1985). Alternativamente, las mutaciones se introducen en el ARN mediante la sustitución de los fragmentos de restricción homólogos en el ADNc que codifica para el ARN, de acuerdo con procedimientos conocidos, o en copias del ADNc mediante el uso de métodos de reacción en cadena de la polimerasa mutágenos.

25

[0039] Opcionalmente, los ácidos nucleicos colaboradores contienen mutaciones que serían letales para el virus si fueran incorporadas en su configuración nativa. Por ejemplo, los genes de la cápside y de la glucoproteína del alfavirus del genoma del VEE están codificados normalmente en un único marco abierto de lectura (ORF). Durante la traducción de este ORF, la cápside se escinde a sí misma del polipéptido en crecimiento en virtud de una actividad de autoproteasa. La actividad de proteasa se basa en un motivo de serina activo similar al de la quimotripsina, que requiere la interacción de otros residuos de aminoácidos distintos (serina, aspartato e histidina). En el gen de la cápside del VEE, los residuos de serina, de aspartato y de histidina residuos están ubicados en los aminoácidos 226, 174 y 152, respectivamente. La mutagénesis de uno o de todos de estos residuos comprometerá la actividad de proteasa de la cápside y dará como resultado virus no viables. Es posible cualquier número de mutaciones en cada residuo, y por lo tanto se denominan conjuntamente como "m226, m174 o m152", en las que la "m" significa "mutante". El número real de residuos es diferente en cada alfavirus, pero son determinados a partir de la secuencia primaria de aminoácidos del ORF de la proteína estructural. En el contexto de un sistema de dos colaboradores, en el que el gen de la cápside es proporcionado individualmente en un ácido nucleico colaborador del gen de la glucoproteína, no se necesita la actividad de autoproteasa. Sin embargo, si se inactiva la actividad de autoproteasa de la proteína de la cápside, cualquier acontecimiento de recombinación que lleve el gen de la glucoproteína al mismo ORF que el gen de la cápside daría como resultado un virus no funcional. Esto es debido a que la proteína de la cápside sería incapaz de escindir a sí misma del polipéptido en crecimiento (por ejemplo, de la glucoproteína). Por lo tanto, la incorporación de dicha mutación en el gen de la cápside anula la función de autoproteasa pero deja inalterada la función de empaquetamiento del ARN de la proteína de la cápside, reduciendo así adicionalmente la probabilidad de producir un virus de replicación competente.

30

35

40

45

50

[0040] También se proporcionan composiciones que comprenden un primer ácido nucleico colaborador según se describe en este documento y un replicón. Opcionalmente, la composición comprende un segundo ácido nucleico colaborador que comprende al menos una secuencia de un microARN objetivo de un microARN endógeno celular y un ácido nucleico que codifica para una proteína estructural del alfavirus, en las que la secuencia de un microARN objetivo está ubicada en la región traducida o no traducida (UTR) del ácido nucleico que codifica para la proteína estructural del alfavirus, y en las que el primer y el segundo ácido nucleico colaborador codifican para diferentes proteínas estructurales del alfavirus. Por ejemplo, el primer ácido nucleico colaborador codifica para al menos una, pero no todas, las proteínas estructurales del alfavirus, y el segundo ácido nucleico colaborador que codifica para al menos una proteína estructural del alfavirus no codificada por el primer ácido nucleico colaborador. El primer y el segundo ácido nucleico colaborador comprenden las mismas o diferentes secuencias del microARN objetivo. Opcionalmente, una proteína estructural del alfavirus en el primer ácido nucleico colaborador es la proteína de la cápside del alfavirus y una proteína estructural del alfavirus en el segundo ácido nucleico colaborador es una glucoproteína del alfavirus, o viceversa. Opcionalmente, la composición comprende adicionalmente una célula de empaquetamiento. Las células de empaquetamiento adecuadas son analizadas con más detalle a continuación.

55

60

65

Como se ha analizado anteriormente, el replicón codifica opcionalmente para un polipéptido, para un polipéptido inmunógeno, para un polipéptido inmunoestimulante o para un producto terapéutico.

[0041] También se proporcionan en el presente documento métodos para la preparación de partículas de replicón semejantes a virus infecciosas de propagación defectuosa en un cultivo celular. Por lo tanto, se proporciona un método para la creación de partículas de replicón semejantes a virus (VRP) que comprende (a) transfectar una célula con (i) un replicón, y (ii) uno o más ácidos nucleicos colaboradores según se describe en este documento, en los que las proteínas estructurales necesarias para crear el replicón semejante a virus están codificadas por uno o más de la célula, el replicón o el ácido nucleico colaborador; y cultivar la célula en unas condiciones que permitan la producción de las partículas ensambladas de replicón semejantes a virus que comprenden el replicón. Opcionalmente, el replicón comprende una señal de empaquetamiento. Opcionalmente, las partículas de replicón semejantes a virus comprenden adicionalmente el (los) ácido(s) nucleico(s) colaborador(es) o un fragmento del (los) mismo(s). Según se utiliza en el presente documento, un fragmento de los mismos se define como una porción del ácido nucleico colaborador que contiene la secuencia o las secuencias de un microARN objetivo. A modo de ejemplo, las proteínas estructurales necesarias para la creación de una partícula de replicón semejantes a virus están codificadas por el (los) ácido(s) nucleico(s) colaborador(es). Opcionalmente, la célula es transfectada con un primer ácido nucleico colaborador y con un segundo ácido nucleico colaborador, en los que el primer ácido nucleico colaborador codifica para al menos una, pero no todas, las proteínas estructurales necesarias para la creación de una partícula de replicón semejantes a virus, y el segundo ácido nucleico colaborador codifica para al menos una o más de las proteínas estructurales del alfavirus no codificadas por el primer ácido nucleico colaborador. Pueden introducirse conjuntamente múltiples moléculas diferentes de ácido nucleico, por ejemplo, el primer y el segundo ácido nucleico colaborador y el ácido nucleico del replicón, en la célula de empaquetamiento. Opcionalmente, las tres moléculas pueden ser ARN o ADN, o una o más moléculas pueden ser ARN y las otras moléculas pueden ser ADN. Opcionalmente, se introduce un inhibidor en el cultivo celular, por ejemplo, mediante una electroporación o mediante una transfección basada en lípidos, para inhibir la actividad del (los) microARN(s) endógeno(s) celular(es) durante el empaquetamiento del ARN del replicón. Opcionalmente, la célula de empaquetamiento se elige de entre aquellas células o líneas celulares que no contienen los microARNs que reconocen las secuencias de microARN objetivo presentes en los ácidos nucleicos colaboradores. Opcionalmente, el replicón codifica para los objetivos del microARN endógeno celular (por ejemplo, microARNs específicos tisulares o específicos de la fase de desarrollo). Opcionalmente, el método comprende adicionalmente la etapa de aislar las VRPs. Las partículas de replicón semejantes a virus son de propagación defectuosa e infecciosas. En las partículas de replicón de alfavirus (ARPs), un vector o un replicón de un alfavirus es opcionalmente modificado para que contenga y exprese uno o más genes de interés. Alternativamente, las ARPs que no expresan un gen de interés o una molécula inhibidora, denominadas en ocasiones ARP vacías (véase, por ejemplo, el documento WO2006/085983 a favor de Johnston y col.), se usan como coadyuvantes para potenciar la respuesta frente a un inmunógeno, incluyendo otra ARP. Por lo tanto, el replicón puede codificar para un polipéptido, para una molécula inmunoestimulante, para un polipéptido inmunógeno, para una molécula terapéutica o para ninguno, como se ha analizado anteriormente. El vector del replicón del alfavirus puede derivar de cualquier alfavirus, tal como del virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEE), del virus de Sindbis, por ejemplo, la cepa TR339, del Arbovirus surafricano N° 86 y del virus del bosque de Semliki, entre otros. Después se introduce el replicón en las células del cultivo que son permisivas para la replicación de los alfavirus y en las que también se han expresado las proteínas estructurales del alfavirus, de forma que el replicón sea empaquetado por las proteínas estructurales en ARPs. Algunos métodos para la producción económica y eficiente de elevados rendimientos de partículas de replicón de alfavirus se describen en la Patente de EE.UU. N° 7.078.218 a favor de Smith y col., que son cepas y virus atenuados específicos útiles para la producción de una ARP.

[0042] En el presente documento se proporcionan células que comprenden uno o más ácidos nucleicos colaboradores, según se describe en este documento, y uno o más replicones. La célula, también denominada célula colaboradora o célula de empaquetamiento, se usa para la producción de partículas de alfavirus infecciosas de propagación defectuosa. La célula debe expresar o ser capaz de expresar las suficientes proteínas estructurales del alfavirus como para empaquetar el ácido nucleico del replicón. Las proteínas estructurales se producen a partir de uno o más ARNs que son introducidos en la célula colaboradora concomitantemente con, o antes de, la introducción del vector del replicón. Dichos ARNs son opcionalmente transformados de forma estable en la línea celular de empaquetamiento. Por lo tanto, se proporciona una célula que comprende un primer ácido nucleico colaborador según se describe en este documento que comprende al menos una secuencia de un microARN objetivo de un microARN endógeno celular y un replicón. La célula comprende opcionalmente adicionalmente un inhibidor del microARN endógeno celular. Dichos inhibidores, que son pequeñas moléculas de ARN, pueden ser introducidos directamente en la célula de empaquetamiento, concomitantemente con el (los) ácido(s) nucleico(s) colaborador(es). Como se ha analizado anteriormente, el replicón opcionalmente codifica para un polipéptido, para un polipéptido inmunógeno o para un producto terapéutico. Opcionalmente, la célula comprende un segundo ácido nucleico colaborador que comprende al menos una secuencia de un microARN objetivo de un microARN endógeno celular y un ácido nucleico que codifica para una proteína estructural del alfavirus, en la que la secuencia de un microARN objetivo está ubicada en la región traducida o no traducida (UTR) del ácido nucleico que codifica para la proteína estructural del alfavirus, y en la que el primer y el segundo ácido nucleico colaborador codifican para diferentes proteínas estructurales del alfavirus. El primer y el segundo ácido nucleico colaborador comprenden las

mismas o diferentes secuencias de microARN objetivo. Opcionalmente, la proteína estructural del alfavirus del primer ácido nucleico colaborador es una proteína de la cápside de un alfavirus y la proteína estructural del alfavirus del segundo ácido nucleico colaborador es una glucoproteína del alfavirus, o viceversa. A modo de ejemplo, el primer ARN colaborador incluye un ARN que codifica para al menos una proteína estructural del alfavirus pero no codifica para todas proteínas estructurales del alfavirus. Opcionalmente, el primer ARN colaborador comprende un ARN que codifica para la glucoproteína E1 del alfavirus, pero que no codifica para la proteína de la cápside del alfavirus ni para la glucoproteína E2 del alfavirus. Alternativamente, el primer ARN colaborador comprende un ARN que codifica para la glucoproteína E2 del alfavirus, pero que no codifica para la proteína de la cápside del alfavirus y la glucoproteína E1 del alfavirus. Opcionalmente, el primer ARN colaborador comprende un ARN que codifica para la glucoproteína E1 del alfavirus y la glucoproteína E2 del alfavirus, pero no para la proteína de la cápside del alfavirus. El primer ARN colaborador comprende opcionalmente un ARN que codifica para la cápside del alfavirus, pero para ninguna de las glucoproteínas del alfavirus. Como otro ejemplo, el primer ARN colaborador puede comprender un ARN que codifica para la cápside y una de las glucoproteínas, es decir, la E1 o la E2, pero no ambas. En combinación con uno cualquiera de estos primeros ARNs colaboradores, el segundo ARN colaborador codifica para al menos una proteína estructural del alfavirus no codificada por el primer ARN colaborador. Por ejemplo, cuando el primer ARN colaborador codifica únicamente para la glucoproteína E1 del alfavirus, el segundo ARN colaborador codifica para una o para ambas de la proteína de la cápside del alfavirus y la glucoproteína E2 del alfavirus. Cuando el primer ARN colaborador codifica únicamente para la proteína de la cápside del alfavirus, el segundo ARN colaborador incluye un ARN que codifica para una o para ambas de las glucoproteínas del alfavirus. Cuando el primer ARN colaborador codifica únicamente para la glucoproteína E2 del alfavirus, el segundo ARN colaborador codifica para una o para ambas de la proteína de la cápside del alfavirus y la glucoproteína E1 del alfavirus. Cuando el primer ARN colaborador codifica tanto para la cápside como para la glucoproteína E1 del alfavirus, el segundo ARN colaborador incluye un ARN que codifica para una o para ambas de la proteína de la cápside del alfavirus y la glucoproteína E2 del alfavirus.

25

[0043] Los términos célula colaboradora y célula de empaquetamiento se usan de forma intercambiable en el presente documento y se refieren a la célula en la que son producidas las partículas del replicón del alfavirus. La célula colaboradora comprende un conjunto de colaboradores que codifican para una o más de las proteínas estructurales del alfavirus. Como se ha divulgado en el presente documento, los colaboradores pueden ser ARN o ADN. La célula puede ser cualquier célula que sea permisiva al alfavirus, es decir, células que son capaces de producir las partículas del alfavirus tras la introducción de un transcrito del ARN vírico. Los alfavirus tienen un amplio abanico de hospedadores. Algunos ejemplos de células de empaquetamiento adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células Vero, células de riñón de cachorro de hámster (BHK), células de fibroblastos embrionarias de pollo, DF-1,293, 293T, células de ovario de hámster chino (CHO) y células de insectos. La célula colaboradora o de empaquetamiento puede incluir opcionalmente una polimerasa de ARN dependiente de ARN heterólogo y/o una proteasa específica de secuencia. Los ácidos nucleicos que codifican para las proteínas estructurales del alfavirus pueden estar presentes en la célula colaboradora temporalmente o mediante una integración estable en el genoma de la célula colaboradora. El ácido nucleico que codifica para las proteínas estructurales del alfavirus que se usa para la producción de las partículas del alfavirus puede estar bajo el control de promotores constitutivos y/o inducibles. Por ejemplo, las secuencias que codifican para las proteínas estructurales del alfavirus se proporcionan en un único ADN colaborador (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 7.045.335 a favor de Smith y col.) o en forma de dos constructos colaboradores que comprenden un elemento IRES en el que la traducción de estas secuencias codificantes puede ser controlada por la actividad de un elemento IRES. Opcionalmente, el elemento IRES es activo en el tipo específico de célula colaboradora, y no es activo, o es mínimamente activo, en otros tipos celulares. Opcionalmente, el (los) colaborador(es) puede(n) comprender un casete de ácidos nucleicos de un promotor subgenómico-IRES-proteína estructural, en el que el promotor subgenómico dirige la transcripción del ARN y el IRES dirige la mayor parte o toda la expresión de la proteína estructural. Las células colaboradoras comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican para las proteínas estructurales del alfavirus en una combinación y/o en una cantidad suficiente para producir una partícula del alfavirus cuando se introduce un ácido nucleico de un replicón recombinante en la célula en unas condiciones en las que las proteínas estructurales del alfavirus son producidas, y el ácido nucleico del replicón recombinante es empaquetado en la partícula del alfavirus.

[0044] Puede emplearse un promotor para dirigir la transcripción del ARN desde el ADN, es decir, una polimerasa de ARN dependiente de ADN, para producir los ácidos nucleicos proporcionados. Un promotor es una secuencia de nucleótidos reconocida por una polimerasa que es suficiente para causar la transcripción de una secuencia asociada (secuencia abajo). En los sistemas colaboradores de ARN y para producir el ARN del replicón, se utiliza un promotor para sintetizar el ARN en una reacción de transcripción *in vitro*, y algunos promotores específicos adecuados para este uso incluyen los promotores de la polimerasa de ARN SP6, T7 y T3. En los sistemas colaboradores de ADN, el promotor funciona dentro de la célula de empaquetamiento para dirigir la transcripción del ARN mensajero que codifica para las proteínas estructurales necesarias para el empaquetamiento. Los potenciales promotores para la transcripción *in vivo* del constructo incluyen promotores eucariotas tales como promotores de la polimerasa II de ARN, promotores de la polimerasa III de ARN o promotores víricos tales como MMTV y MoSV LTR, la región temprana del SV40, del RSV o del CMV. Hay disponibles muchos otros promotores adecuados de mamíferos y víricos. Alternativamente, pueden emplearse promotores de la polimerasa de ARN dependiente de ADN procedentes de bacterias o de bacteriófagos, por ejemplo, SP6, T7 y T3, para su uso *in vivo*, con la correspondiente polimerasa

65

de ARN que se va a proporcionar a la célula, tanto a través de un plásmido individual como de un vector de ARN o un vector vírico. Opcionalmente, la correspondiente polimerasa de ARN puede ser transformada de forma estable en una línea celular colaboradora bajo el control de un promotor inducible.

5 **[0045]** Los constructos de ADN que funcionan dentro de una célula pueden funcionar como plásmidos autónomos transfectados en la célula, o pueden ser transformados de forma estable en el genoma. El promotor es opcionalmente un promotor constitutivo, es decir, un promotor que, cuando es introducido en una célula y unido operativamente a una secuencia que está secuencia abajo, dirige la transcripción de la secuencia que está secuencia abajo tras su introducción en la célula, sin la necesidad de añadir moléculas de inducción o de un cambio
10 en las condiciones de inducción. Alternativamente, el promotor puede estar regulado, es decir, no actuando constitutivamente para causar la transcripción de la secuencia asociada. Un promotor regulado puede ser, por ejemplo, inducible. Un promotor inducible actúa de forma que la célula sólo produce el ARN mensajero funcional codificado por el constructo cuando la célula se expone al estímulo apropiado (inductor). Un promotor inducible transcribe la secuencia asociada únicamente cuando (i) hay presente una molécula de inducción en el medio en el que se cultivan las células, o (ii) se modifican las condiciones a las que están expuestas las células para que sean
15 condiciones de inducción. Cuando se usa un promotor inducible, los constructos colaboradores son introducidos en la célula de empaquetamiento concomitantemente con, antes de (temporalmente, a través de una transformación estable de la línea celular de empaquetamiento), o después de, la exposición al inductor, y la expresión de las proteínas estructurales del alfavirus se produce cuando están presentes tanto los constructos como el inductor.
20 Alternativamente, los constructos diseñados para funcionar dentro de una célula pueden ser introducidos en la célula a través de un vector vírico, por ejemplo, adenovirus, poxvirus, virus adenoasociados, SV40, retrovirus, nodavirus, picornavirus, virus de la estomatitis vesicular virus y baculovirus con promotores de la pol II de mamífero.

[0046] Opcionalmente, el replicón del vector de ARN es transcrito *in vitro* a partir de un plásmido de ADN y
25 después es introducido en la célula colaboradora mediante una electroporación. Alternativamente, el replicón del vector de ARN es transcrito *in vivo* a partir de un plásmido de un vector de ADN que es transfectado en la célula colaboradora (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.814.482 a favor de Dubensky y col.), o es administrado a la célula colaboradora a través de un virus o de una partícula similar a un virus. Una vez que hay presente un transcrito de ARN (ARNm) que codifica para los vectores del replicón colaborador o de ARN en la célula
30 colaboradora (tanto mediante una metodología *in vitro* como *in vivo*), finalmente es traducido para producir los polipéptidos o las proteínas codificados.

[0047] También se proporcionan métodos para la inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprenden la administración al sujeto de una población de partículas semejantes a virus según se describe en este
35 documento o creadas mediante los métodos descritos en el presente documento. A los sujetos se les administran composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad inmunógena de las partículas de replicón semejantes a virus infecciosas de propagación defectuosa junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptable incluyen, pero no se limitan a, agua estéril exenta de pirógenos, solución salina fisiológica estéril exenta de pirógenos, agua estéril, solución salina, glucosa, glicerol, etanol, o
40 similares, y combinaciones de los mismos, así como estabilizantes, por ejemplo, HSA u otras proteínas y azúcares reductores adecuados. Los sujetos a los que se les pueden administrar cantidades inmunógenas de las partículas de alfavirus infecciosas de replicación defectuosa de la presente invención incluyen sujetos humanos y animales (por ejemplo, perro, gato, ganado, caballo, cerdos, burro, ratón, hámster, monos, cobayas, aves, huevos). La administración puede realizarse mediante cualquier medio adecuado, tal como una administración intraperitoneal,
45 intramuscular, intradérmica, intranasal, intravaginal, intrarrectal, subcutánea o intravenosa.

[0048] Las composiciones inmunógenas que comprenden las VRPs (que dirigen la expresión de la(s) secuencia(s) de interés cuando las composiciones son administradas a un ser humano o a un animal) o las preparaciones coadyuvantes que comprenden las VRPs (que no expresan ningún ácido nucleico que codifica para antígenos o
50 inhibidores) producidas mediante el uso de los métodos descritos en el presente documento se formulan mediante cualquiera de los medios conocidos. Dichas composiciones se preparan normalmente en forma de inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas. También pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su disolución o suspensión en un líquido antes de su inyección. También son adecuadas las preparaciones liofilizadas.

[0049] Las composiciones inmunógenas (o biológicamente activas de otro modo) que contienen las VRP se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea profilácticamente y/o terapéuticamente eficaz. Según se usa en este documento, una cantidad inmunógena es una cantidad de partículas semejantes a virus infecciosas que es suficiente para provocar una respuesta inmunitaria en el sujeto en el que se administra la formulación farmacéutica. La cantidad que se va a administrar, que está
60 generalmente en el intervalo de entre aproximadamente 10^2 y aproximadamente 10^{12} unidades infecciosas por ml en una dosis, depende del sujeto que se va a tratar, de la vía a través de la cual se administran las VRPs, de la inmunogenicidad del producto de expresión, de los tipos deseados de respuestas inmunitarias efectoras y de los grados de protección deseados. Opcionalmente, se administran al sujeto entre aproximadamente 10^6 y 10^{12} unidades infecciosas, o VRPs, por dosis. Opcionalmente, se administran al sujeto entre aproximadamente 10^{10} y
65 10^{12} unidades infecciosas, o VRPs, por dosis. Opcionalmente, se administran al sujeto aproximadamente 10^6 , 10^7 o

10⁸ unidades infecciosas, o VRPs, por dosis. Las cantidades precisas del principio activo requeridas para su administración pueden depender del juicio del médico, del veterinario o de otro profesional sanitario y pueden ser peculiares para cada individuo, pero dicha determinación está en la pericia de dicho profesional.

5 **[0050]** La composición farmacéutica se administra con una cronología de dosis única o de dosis múltiple. Una cronología de dosis múltiple es aquella en la que un primer ciclo puede incluir entre 1 y 10, o más, dosis individuales, seguido de otras dosis administradas en momentos posteriores a los intervalos de tiempo requeridos para mantener o para reforzar la respuesta inmunitaria, por ejemplo, semanalmente o a los entre 1 y 4 meses para una segunda dosis, y si fuera necesario, una(s) dosis posterior(es) después de varios meses / años.

10

[0051] Como se ha analizado anteriormente, se contempla que puedan modificarse otros sistemas de vector basados en virus que incluyen, por ejemplo, sistemas de vector retrovíricos (por ejemplo, virus de células madre murinas), lentivirus, herpesvirus y adenovirus, según se describe en este documento para los alfavirus. En estos sistemas se ha eliminado una función crítica del virus parental para crear un sistema de vector de replicación / propagación deficiente. La función crítica se proporciona en *trans* durante la producción de las partículas semejantes a virus, y el uso del miARN objetivo según se describe en este documento permite una reducción significativa en la probabilidad de regeneración de un virus funcional de replicación competente en el receptor. Según se usa en este documento, la frase sistema de vector se refiere a los componentes necesarios para crear partículas semejantes a virus. Por ejemplo, un sistema de vector comprende un vector que está empaquetado en las partículas semejantes a virus y uno o más ácidos nucleicos adicionales que codifican para los genes necesarios para la producción de la partícula semejante a virus. Opcionalmente, el vector también comprende uno o más genes necesarios para la producción de la partícula semejante a virus. Según se usa en este documento, la función crítica puede ser un gen necesario para la producción de una partícula semejante a virus, tal como un gen estructural (es decir, un gen que codifica para una proteína de la cubierta tal como una proteína VSVG) o un gen necesario para la replicación del virus (es decir, un gen que codifica para una proteína polimerasa, tal como la proteína E1a de Adenovirus).

[0052] Por lo tanto, se proporciona un sistema de vector que comprende un ácido nucleico colaborador que comprende (i) al menos una secuencia de un microARN objetivo de un microARN endógeno celular y (ii) un ácido nucleico que codifica para una proteína estructural vírica, en los que la secuencia objetivo está ubicada en la UTR en 3', en la UTR en 5' o en la región traducida de la proteína estructural vírica, y un vector. También se proporcionan sistemas de vector que comprenden un ácido nucleico colaborador que comprende (i) al menos una secuencia de un microARN objetivo de un microARN endógeno celular, y (ii) un ácido nucleico que codifica para una proteína vírica esencial para la replicación del virus, y un vector. El ácido nucleico colaborador y/o el vector es ADN o ARN. Opcionalmente, el ácido nucleico colaborador está ubicado en una célula de empaquetamiento. Opcionalmente, el ácido nucleico colaborador está ubicado en un plásmido en la célula de empaquetamiento. Como se ha analizado anteriormente para los replicones, el vector codifica opcionalmente para un polipéptido, para una molécula inmunoestimulante, para un polipéptido inmunógeno o para un producto terapéutico.

[0053] Opcionalmente, el sistema de vector es un sistema de vector de ciclo único o un sistema de vector de ciclo limitado. Según se usa en este documento, el término sistema de vector de ciclo único se refiere a un sistema de vector que produce partículas víricas que son infecciosas pero de propagación defectuosa, es decir, el virus no puede propagarse más allá de la célula hospedadora que inicialmente han infectado las partículas. Según se usa en este documento, el término sistema de vector de ciclo limitado se refiere a un sistema de vector que produce partículas víricas que son infecciosas y tienen una capacidad de propagación limitada. Por ejemplo, las partículas víricas producidas a partir de sistemas de vector de ciclo limitado pueden propagarse más allá de la célula hospedadora que inicialmente han infectado las partículas, pero no son virulentas (es decir, las partículas víricas no son patógenas por sí mismas).

[0054] Como se ha analizado anteriormente, la secuencia de un microARN objetivo del ácido nucleico colaborador está ubicada, por ejemplo, en la región traducida, en la UTR en 5' o en la UTR en 3' del ácido nucleico que codifica para la proteína estructural. Opcionalmente, al menos una secuencia objetivo está ubicada en la UTR en 3' del ácido nucleico que codifica para una proteína estructural y al menos una secuencia objetivo está ubicada en la UTR en 5' del ácido nucleico que codifica para una proteína estructural o para una proteína vírica esencial para la replicación del virus. Preferiblemente, la secuencia de un microARN objetivo está ubicada en la UTR en 3' del ácido nucleico que codifica para la proteína estructural o para la proteína vírica esencial para la replicación y/o la propagación del virus.

[0055] Opcionalmente, los sistemas de vector proporcionados comprenden adicionalmente un segundo ácido nucleico colaborador que comprende al menos una secuencia de un microARN objetivo de un microARN endógeno celular y un ácido nucleico que codifica para la(s) proteína(s) estructural(es) vírica(s) o que codifica para proteína(s) vírica(s) esencial(es) para la replicación y/o la propagación del virus. El primer y el segundo ácido nucleico colaborador comprenden las mismas o diferentes secuencias del microARN objetivo.

[0056] Algunas proteínas estructurales víricas incluyen, pero no se limitan a, las proteínas estructurales de lentivirus, de herpesvirus, de rhabdovirus, de picornavirus, del virus de la leucemia murina o felina, de adenovirus y

de flavivirus. Algunos ejemplos de proteínas estructurales de lentivirus incluyen las proteínas estructurales del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Algunos ejemplos de proteínas estructurales de herpesvirus (HSV) incluyen las proteínas estructurales del HSV-1. Algunos ejemplos de proteínas estructurales de rhabdovirus incluyen las proteínas estructurales del virus de la estomatitis vesicular (VSV).

5

[0057] Algunas proteínas víricas esenciales para la replicación y/o para la propagación (por ejemplo, proteínas no estructurales) se eligen de entre el grupo que consiste en una proteína esencial para la replicación de lentivirus, de herpesvirus, de rhabdovirus, de picornavirus, del virus de la leucemia murina o felina, de adenovirus y de flavivirus. Algunos ejemplos de proteínas esenciales para la replicación de lentivirus incluyen las proteínas esenciales para la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Algunos ejemplos de proteínas esenciales para la replicación de herpesvirus (HSV) incluyen las proteínas esenciales para la replicación del HSV-1. Algunos ejemplos de proteínas esenciales para la replicación de rhabdovirus incluyen las proteínas esenciales para la replicación del virus de la estomatitis vesicular (VSV).

10

[0058] Como un ejemplo, los sistemas de empaquetamiento de vectores lentivíricos proporcionan constructos de empaquetamiento individuales para gag/pol y env, y normalmente emplean una proteína de la cubierta heteróloga o modificada funcionalmente por razones de seguridad. Véase, por ejemplo, Miller y Buttimore, *Mol. Cell. Biol.* 6 (8): 2895 - 902 (1986). Según se usa en este documento, el término constructo de empaquetamiento se refiere a un constructo que comprende un gen que codifica para una proteína que es necesaria para el empaquetamiento del virus. Esto difiere de la señal de empaquetamiento, que está ubicada en el ácido nucleico que va a ser empaquetado en el virus. Estas modificaciones minimizan la homología entre el genoma del empaquetamiento y el vector vírico, de forma que se reduce la capacidad del vector para formar recombinantes (véase, por ejemplo, Miller y Rosman, *BioTechniques* 7 (9): 980 - 90 (1989)). Para otros sistemas de vectores lentivíricos, los genes accesorios vif, vpr, vpu y nef, son deletados o inactivados, y las funciones de empaquetamiento se dividen en dos genomas: un genoma expresa los productos de los genes gag y pol, y el otro genoma expresa el producto del gen env (véase, por ejemplo, Bosselman y col., *Mol. Cell. Biol.* 7 (5): 1797 - 806 (1987); Markowitz y col., *J. Virol.* 62 (4): 1120 - 4 (1988); Danos y Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85: 6460 - 6464 (1988)). Por lo tanto, los microARN objetivo pueden posicionarse en la región traducida o en la no traducida de los ácidos nucleicos que codifican para estos genes, para evitar la formación de virus de replicación competente.

20

[0059] Se han descrito sistemas de replicón basados en flavivirus (Khromykh y col., *J. Virol.* 72: 5967 - 77 (1998); Scholle y col., *J. Virol.* 78: 11605 - 14 (2004); e Yoshii y col., *Vaccine* 23: 3946 - 56 (2005)). Los sistemas de replicón basados en flavivirus tienen la región codificante del gen de la proteína estructural deletada, que hace que el vector del replicón sea incapaz de producir una nueva progenie en las células que no los suministran *in trans*. Como se ha descrito para los vectores de alfavirus, la introducción de secuencias de miARN objetivo en la UTR en 5' y/o en 3' de los transcritos que proporcionan las proteínas estructurales de los flavivirus se dirige a aquellos ARNs para su destrucción por parte de los miARNs celulares cuando no hay presentes inhibidores del miARN. Si durante la producción de las partículas de replicón del flavivirus en las células de empaquetamiento, un acontecimiento de recombinación restaura la región codificante de la proteína estructural en el vector del replicón, la subsiguiente partícula todavía sería de propagación defectuosa. Esto es debido a que cuando se introduce en otras células, el ARN de la proteína estructural sería señalado para su degradación por parte de la maquinaria de degradación del miARN celular.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

230

235

240

245

250

255

260

esenciales para la replicación son señalados para su degradación por parte de la maquinaria de degradación del miARN. En otras palabras, si se producen acontecimientos de recombinación del ADN que generen un complemento completo de los genes del adenovirus, las proteínas esenciales de replicación y de empaquetamiento no serían expresadas debido a la señalización del miARN para la degradación de los transcritos del ARNm en células infectadas posteriormente.

[0062] La misma estrategia descrita anteriormente funcionará para vectores de vacuna basados en el virus del herpes simple de tipo 1 (HSV-1) de replicación incompetente o desactivado de ciclo infeccioso único (DISC) (Farrell y col., J. Virol. 68: 927 - 32 (1994); y Weir y Elkins, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 90: 9140 - 4 (1993)). Estos vectores de HSV-1 tienen deleciones de genes esenciales en sus genomas víricos (por ejemplo, el gen ICP4 y el gen gH) que los hacen de replicación o de propagación incompetente. Las partículas semejantes a virus del HSV-1 pueden ser producidas si las proteínas codificadas por las porciones delecionadas del genoma son proporcionadas en *trans* por líneas celulares que las expresan de una forma continua o inducible. La ubicación del miARN objetivo en los genes esenciales expresados en la célula de empaquetamiento señalaría los ARNms para su degradación en células infectadas posteriormente. En otras palabras, si se produce una recombinación de ADN - ADN entre los genes esenciales expresados por la célula de empaquetamiento y los vectores del HSV-1, los genes esenciales no serían expresados en las células infectadas posteriormente debido a la señalización del miARN para la degradación de los transcritos del ARNm del gen esencial.

[0063] Adicionalmente se proporcionan kits que comprenden uno o más de los ácidos nucleicos colaboradores descritos en el presente documento. Como un ejemplo, el kit comprende un ácido nucleico colaborador que comprende al menos una secuencia de un microARN objetivo de un microARN endógeno celular y un ácido nucleico que codifica para una proteína estructural del alfavirus, en el que la secuencia de un microARN objetivo está ubicada en una región del ácido nucleico que codifica para la proteína estructural del alfavirus. Por ejemplo, la secuencia de un microARN objetivo puede estar en la región traducida o no traducida de la proteína estructural del alfavirus. Opcionalmente, los kits comprenden adicionalmente cualquiera de los replicones descritos en el presente documento. Opcionalmente, los kits comprenden adicionalmente cualquiera de las células descritas en el presente documento. Opcionalmente, el kit comprende una población de partículas de replicón semejantes a alfavirus (ARPs). Las ARPs pueden comprender, por ejemplo, un primer subconjunto de partículas que comprende un replicón y un segundo subconjunto de partículas que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos colaboradores o fragmentos de los mismos descritos en el presente documento y un replicón. Opcionalmente, los kits comprenden adicionalmente las instrucciones para la creación de las partículas de replicón semejantes a virus. Las instrucciones pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de los métodos de elaboración de las partículas de replicón semejantes a virus descritos en el presente documento.

[0064] Se divulgan materiales, composiciones y componentes que pueden ser usados para, que pueden ser usados junto con, que pueden ser usados en la preparación de, o que son productos de, los métodos y las composiciones divulgados. Estos y otros materiales son divulgados en el presente documento, y se entiende que cuando se divulgan combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc. de estos materiales que, aunque puede no divulgarse explícitamente una referencia específica a cada una de las diversas combinaciones y permutaciones individuales y colectivas de estos compuestos, cada uno está específicamente contemplado y descrito en el presente documento. Por ejemplo, si se divulga y se analiza un método y se analizan varias de las modificaciones que pueden realizarse en varias de las moléculas que incluye el método, todas y cada una de las combinaciones y permutaciones del método, y las modificaciones que son posibles, están específicamente contempladas salvo que específicamente se indique lo contrario. Asimismo, cualquier subconjunto o combinación de estas también está específicamente contemplado y divulgado. Este concepto se aplica a todos los aspectos de esta divulgación incluyendo, pero no se limitan a, las etapas de los métodos que usan las composiciones divulgadas. Por lo tanto, si existen varias etapas adicionales que puedan ser llevadas a cabo, se entiende que cada una de estas etapas adicionales puede llevarse a cabo con cualquier etapa de un método específico o combinación de etapas de un método de los métodos divulgados, y que cada una de dichas combinaciones o subconjuntos de combinaciones está específicamente contemplada y debe ser considerada como divulgada.

Ejemplos

55 Materiales y Métodos

[0065] *Construcción de colaboradores que contienen secuencias del microARN (miARN) objetivo de hebra positiva en 3'.* Este conjunto de colaboradores se diseñó para tener el objetivo de la acción del miARN celular presente en la región UTR en 3' del mensaje del ARN de hebra positiva producido durante la replicación del colaborador. El diseño del colaborador está representado esquemáticamente en la Figura 1. Se sintetizó un fragmento de ADN que codificaba para la secuencia complementaria inversa (RC) de seis microARNs (miARN) diferentes alineados en tándem (5'-gcatgcaactatacaacctactacctcaacacagtcgaaggctcagggacttcagttatcacagtagctgtagatccccctatcacgattagcattaaactcctgcactgtaagcactttgtcagtttgcatagattgcacagtttaac-3' (ID. SEC. N°: 17). Las secuencias del miARN objetivo eran específicas para let-7 (RC1; 5'-aactatacaacctactacctca-3' (ID. SEC. N°: 11)), lin-4 (RC2; 5'-acacagtcgaaggctcagga-

3' (ID. SEC. N°: 12)), miR-101(RC3; 5'-cttcagtattcacagctactgta-3' (ID. SEC. N°: 13)), miR155 (RC4; 5'-cccctatcacgattagcattaa-3' (ID. SEC. N°: 14)), miR-17 (RC5; 5'-actacgtcactgtaagcactttg-3' (ID. SEC. N°: 15)) y miR-19 (RC6; 5'-tcagtttgcatagattgcaca-3' (ID. SEC. N°: 16)). Se diseñó un sitio de restricción SphI único antes de la secuencia del miARN objetivo más en 5' (let-7), se diseñó un sitio de restricción EcoRV único entre la tercera (miR-101) y la cuarta (miR-155) secuencia del miARN objetivo y se diseñó un sitio de restricción Pml único después de la última secuencia del miARN (miR-19) objetivo. Además, inmediatamente secuencia debajo de las secuencias del miARN objetivo también se sintetizaron 63 pares de bases (pb) correspondientes a la región no codificante (NCR) en 3' del virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEE), 55 pb correspondientes a un tramo de poli (A) y 8 pb correspondientes a un sitio de restricción NotI único. El fragmento de 281 pb fue digerido con las enzimas de restricción SphI y NotI y después se ligó en los plásmidos colaboradores de la cápside (dHcap6-mut1 (W-stop)) y GP (dHgp6-mut1) linealizados con las mismas dos enzimas. Los plásmidos colaboradores resultantes se denominaron dHcap6-mut1 (W-stop)RC1-6 y dHgp6-mut1-RC1-6. Los miARN objetivo están representados por los identificadores 1 hasta 6 y están numerados en el orden indicado más arriba (let-7 = 1, lin-4 = 2, miR-101 = 3, miR155 = 4, miR-17, = 5 y miR-19 = 6).

[0066] Se construyeron plásmidos colaboradores que codifican para las tres primeras secuencias del miARN objetivo (let-7, lin-4 y miR-101; 5'-gcatgcaactatacaacctactactcaacacagtcgaaggctcagggactcagttatcacagctactgta-3' (ID. SEC. N°: 18)) o para las tres últimas (miR155, miR-17 y miR-19; 5'-cccctatcacgattagcattaaactcctgactgtaagcactttgtagttgcatagattgacagtttaaac-3' (ID. SEC. N°: 19)). Los colaboradores con los tres primeros miARN objetivo (1 - 3) se construyeron mediante una digestión de los colaboradores dHcap6-mut1(W-stop)RC1-6 y dHgp6-mut1-RC1-6 con las enzimas de restricción EcoRV y NotI para eliminar los miARN objetivo 4 - 6 y la NCR en 3' del VEE. La NCR en 3' del VEE fue sustituida mediante la digestión de dHcap6-mut1 (W-stop) con SphI, el tratamiento del ADN con polimerasa de ADN T4 para producir un extremo romo y digiriendo después el ADN adicionalmente con NotI para liberar un fragmento de 122 pb. El fragmento de 122 pb se ligó después en los colaboradores de la cápside y de la gp digeridos con las EcoRV / NotI anteriores, generando los colaboradores denominados dHcap6-mut1(W-stop)RC1-3 y dHgp6-mut1-RC1-3.

[0067] Se construyeron colaboradores que codifican para los tres últimos miARN objetivo (4 - 6) mediante la digestión de los colaboradores dHcap6-mut1(W-stop)RC1-6 y dHgp6-mut1-RC1-6 con las enzimas de restricción EcoRV y RsrII para eliminar los genes de la cápside o de la gp y los miARN objetivo 1 - 3. Los genes de la cápside y de la gp fueron sustituidos mediante la digestión del ADN de dHcap6-mut1 (W-stop) o de dHgp6-mut1 con SphI, el tratamiento de los ADNs con polimerasa de ADN T4 para producir un extremo romo y después digiriendo adicionalmente el ADN con RsrII para liberar los genes estructurales de la proteína del VEE. Los fragmentos de los genes de la cápside y de la gp RsrII / SphI(T4) fueron purificados en gel y después ligados en los esqueletos de los plásmidos de los miARN 4 - 6 digeridos con RsrII / EcoRV descritos anteriormente, generando los colaboradores denominados dHcap6-mut1(W-stop)RC4-6 y dHgp6-mut1-RC4-6.

[0068] También se construyeron los colaboradores que codifican para cualquiera de los miARN objetivo individuales o para combinaciones de dos miARN objetivo. Para generar los colaboradores que contenían el miARN objetivo se usó una metodología similar a la que se usó para la producción de los colaboradores de los miARN objetivo 1 - 3 y 4 - 6 descritos anteriormente. Los cebadores de la PCR se diseñaron para que pudieran amplificar tanto el miARN objetivo individual como las combinaciones de los dos miARN objetivo. Los cebadores y los moldes de ADN usados para la amplificación del miARN objetivo están resumidos en la Tabla 1. Los miARN objetivo se clonaron en los colaboradores dHcap6-mut1 (W-stop) o dHgp6-mut1 como se ha descrito anteriormente, bien como fragmentos RsrII / Pml (miARN objetivo 1, 1 - 2, 3, 4, 4 - 5 y 5) o bien como fragmentos SphI / NotI (miARN objetivo 6 y 5 - 6). Todos los constructos de miARN colaboradores se secuenciaron para asegurar que no se habían introducido errores durante la amplificación mediante PCR.

Tabla 1: cebadores y moldes de ADN.

miARN objetivo	Cebador directo	Cebador inverso	Molde para la PCR del miARN
1	T7 (5'- TTAATACGACTC ACTATAG-3' (ID. SEC. N°: 1))	let-7 RC (Pml) R (5'-GGGGTTTAAA CTGAGGTAGTAGTTGTATAGTT- 3' (ID. SEC. N°: 6))	Colaborador del miARN de la cápside o de la gp 1 - 3
1 - 2	T7 (ID. SEC. N°: 1)	lin-4 RC (Pml) R (5'-GGGGTTTAAA CTCCTGAGACCTTCGACTGTGT - 3' (ID. SEC. N°: 7))	Colaborador del miARN de la cápside o de la gp 1 - 3
3	miR-101 RC (SphI) F (5'- TTTGCATGCCTTCAGTT ATCACAGTACTGTA-3' (ID. SEC. N°: 2))	3-l.lprl (5'-TAAGAGCCGCGAGCG ATCCT-3' (ID. SEC. N°: 8))	Colaborador del miARN de la cápside o de la gp 1 - 3

miARN objetivo	Cebador directo	Cebador inverso	Molde para la PCR del miARN
2 - 3	lin-4 RC (SphI) F (5'-TTT GCATGCACACAGT CGA AGGTCTCAGGGA-3' (ID. SEC. N°: 3))	3-1.1 pr1 (ID. SEC. N°: 8)	Colaborador del miARN de la cápside o de la gp 1 - 3
2	T7 (ID. SEC. N°: 1)	lin-4 RC (PmeI) R (ID. SEC. N°: 7)	Colaborador del miARN de la cápside o de la gp 2 - 3
4	T7 (ID. SEC. N°: 1)	miR-155 RC (PmeI) R (5'-GGGTTTAA ACTTAATGCTAATCGTGATAGGG G-3' (ID. SEC. N°: 9))	Colaborador del miARN de la cápside o de la gp 4 - 6
4 - 5	T7 (ID. SEC. N°: 1)	miR-17 RC (PmeI) R (5'-GGGTTTAA ACCAAAGTGCTTACAGTGCAGGT AGT-3' (ID. SEC. N°: 10))	Colaborador del miARN de la cápside o de la gp 4 - 6
5	T7 (ID. SEC. N°: 1)	miR-17 RC (PmeI) R (ID. SEC. N°: 10)	Colaborador del miARN de la cápside o de la gp 5 - 6
5 - 6	miR-17 RC (SphI) F (5'-CA TGCATGCACTACCTGCA CTGTAAGCACTTTG-3' (ID. SEC. N°: 4))	3-1.1pr1 (ID. SEC. N°: 8)	Colaborador del miARN de la cápside o de la gp 4 - 6
6	miR-19 RC (SphI) F (5'-CA TGCATGCTCAGTTTTGC ATAGATTTGCACA-3' (ID. SEC. N°: 5))	3-1.1 pr1 (ID. SEC. N°: 8)	Colaborador del miARN de la cápside o de la gp 4 - 6

[0069] También se construyeron colaboradores que codifican para el miARN objetivo individual repetido seis veces, en el ARN mensajero de hebra positiva producido durante la replicación del colaborador. Se eligieron seis copias de cada miARN objetivo individual porque es el número total de miARN objetivo ensayado en los constructos RC1-6, y la longitud de la secuencia insertada en la NCR en 3' también se mantendría en los nuevos constructos con respecto a los constructos RC1-6. Se sintetizaron *de novo* fragmentos de ADN (BlueHeron Biotechnology, Inc.; Bothell, WA) que codifican para la secuencia RC de las seis copias de cada miARN individual alineadas en tándem. Los identificadores para los respectivos fragmentos de miARN 6mero eran: RC1x6, RC2x6, RC3x6, RC4x6, RC5x6 y RC6x6. Se diseñó un sitio de restricción SphI único antes de la primera secuencia del miARN objetivo, se diseñó un sitio de restricción EcoRV único entre la tercera y la cuarta copia de la secuencia del miARN objetivo y se diseñó un sitio de restricción PmeI único después de la última copia de la secuencia del miARN objetivo. Los respectivos fragmentos de secuencia de los miARNx6 se digirieron con las enzimas de restricción SphI y PmeI y después se ligaron individualmente en lugar del fragmento de secuencia del miARN1-6 encontrado en dHcap6-mut1(W-stop)RC1-6 o dHgp6-mut1-RC1-6, mediante la digestión de los colaboradores con las enzimas de restricción SphI y PmeI. Los colaboradores de la cápside resultantes se denominaron dHcap6-mut1(W-stop)RC1x6, dHcap6-mut1(W-stop)RC2x6, dHcap6-mut1(W-stop)RC3x6, dHcap6-mut1(W-stop)RC4x6, dHcap6-mut1(W-stop)RC5x6 y dHcap6-mut1(W-stop)RC6x6. Los colaboradores de la GP resultantes se denominaron dHgp6-mut1-RC1x6, dHgp6-mut1-RC2x6, dHgp6-mut1-RC3x6, dHgp6-mut1-RC4x6, dHgp6-mut1-RC5x6 y dHgp6-mut1-RC6x6.

[0070] También se construyeron colaboradores que codifican para tres copias de una secuencia del miARN objetivo (por ejemplo, RC1x3). Esto se llevó a cabo de dos formas. Para los miARN objetivo RC1 - RC6, los colaboradores que contenían las tres copias fueron producidos mediante la digestión de los colaboradores de la cápside y de la gp que contenían las seis copias de un miARN objetivo individual (por ejemplo, RC1x6) con las enzimas de restricción EcoRV y PmeI. Esta digestión libera un fragmento de 75 pb eliminando 3 de las 6 copias del miARN objetivo de cada colaborador. Los ADNs digeridos con EcoRV / PmeI se volvieron a ligar sobre sí mismos generando los colaboradores de la cápside y de la gp con 3 miARN objetivo en sus UTR en 3'. Se identificaron seis secuencias de miARN objetivo adicionales (RC7 - RC12) que se sabía que tenían una actividad específica del tipo de célula o de tejido que los objetivos más ampliamente activos representados por RC1 - RC6. Los miARN objetivo para RC7 - RC12 son como sigue: RC7 = miR-143 (5'-gagctacagtgtctcatctca-3' (ID. SEC. N°: 20)); RC8 = miR-30b (5'-agctgagtgtaggatgtttaca-3' (ID. SEC. N°: 21)); RC9 = miR-181 (5'-actcaccgacagcggtgaatgtt-3' (ID. SEC. N°: 22)); RC10 = miR-124 (5'-ggcattcaccgctgcctta-3' (ID. SEC. N°: 23)); RC11 = miR-1 (5'-atacatactctttacattcca-3' (ID. SEC. N°: 24)); y RC12 = miR-133a (5'-cagctggtgaaggggacaaa-3' (ID. SEC. N°: 25)). Se produjeron colaboradores de la cápside que contenían secuencias objetivo que consisten en tres copias de cada secuencia específica de miARN objetivo de la siguiente forma. Se diseñaron cebadores inversos de la PCR que codificaban para cada secuencia de miARN objetivo por triplicado (por ejemplo, RC7x3 R (5'-GCGTTTAAACTGAGATGAAGCACTGTAGCTGTGAGAT GAAGCACTGTAGC TCTGAGATGAAGCACTGTAGCTGCGATGCTTACCATTGCTCGCAGTTCTCC GGAGTATACTTCACGGTAACTCCC-3' (ID. SEC. N°: 26)); RC8x3 R (5'-GCGTTTAAACTGTAAACATCCTACACTCAGCTTGTAACATCCTACACTCA GCTTGTAACATCCTACACTCAGCTGCGATGCTTACCATTGCTCGCAGTTCT CCGGAGTATACTTCACGGTAACTCCC-3' (ID. SEC. N°: 27)); RC9x3 R (5'-

GCGTTTAAACAACATTCAACGCTGTCGGTGAGTAACATTCAACGCTGTCG GTGAGTAACATTCAACGCTGTCG-
 GTGAGTGCATGCTTACCATTGCTCGCAG TTCTCCGGAGTATACTTCACGGTAACTCCC-3' (ID. SEC. N°: 28));
 RC10x3 R (5'-GCGTTTAAACTAAGGCACGCGGTGAATGCCTAAGGCACGCGGTGAATGCC
 TAAGGCACGCGGTGAATGCCGCATGCTTACCATTGCTCGCAGTTCTCCGG AGTATACTTCACGGTAACTCCC-3'
 5 (ID. SEC. N°: 29)); RC11x3 R (5'-GCGTTTAAACTGGAATGTAAGAAGTATGTATTGGAATGTAAGAAGTAT
 GTATTGGAATGTAAGAAGTATGTATGCATGCTTACCATTGCTCGCAGTTC
 TCCGGAGTATACTTCACGGTAACTCCC-3' (ID. SEC. N°: 30)); y RC12x3 R (5'-
 GCGTTTAAACTTTGGTCCCCTTCAACCAGCTGTTTGGTCCCCTTCAACCAG
 CTGTTTGGTCCCCTTCAACCAGCTGGCATGCTTACCATTGCTCGCAGTTCT
 10 CCGGAGTATACTTCACGGTAACTCCC-3' (ID. SEC. N°: 31))) y una región de un colaborador homólogo de la
 secuencia de la cápside. Estos cebadores inversos se combinaron después con un cebador directo específico para
 el gen de la cápside (cápside (RsrII) F; 5'- CCTCGGACCGACCATGTTCCCGTTCAGCCAATG-3' (ID. SEC. N°:
 32)) para amplificar un producto de la PCR que codificaba para el gen completo de la cápside, tres copias de cada
 15 PCR capsid-RCx3 se digirieron después con las enzimas de restricción RsrII y PmeI y se usaron para reemplazar la
 región RsrII/PmeI del ADN de dHcap6-mut1(W-stop)RC1-6, generando dHcap6-mut1(W-stop)RC7x3, dHcap6-
 mut1(W-stop)RC8x3, dHcap6-mut1(W-stop)RC9x3, dHcap6-mut1 (W-stop)RC10x3, dHcap6-mut1 (W-stop)RC11x3
 and dHcap6- mut1(W-stop)RC12x3. Se secuenció la totalidad de las regiones de la cápside y de la secuencia del
 20 miARN objetivo para asegurar que no se habían introducido errores durante la amplificación mediante PCR. Las
 secuencias objetivo RC7 - RC12 se diseñaron con un sitio de restricción SphI en 5' único y un sitio de restricción
 NotI en 3' único. Cada uno de los ADNs de los miARN colaboradores de la cápside objetivo (RC7x3 - RC12x3) se
 digirieron con las enzimas de restricción SphI y NotI para liberar el trímero de ~ 190 pb de las secuencias del miARN
 objetivo. Cada fragmento de trímero de ~ 190 pb del miARN objetivo (SphI/Not) se ligó después en el ADN
 linealizado de dHgp6-mut1 con las enzimas de restricción SphI y NotI para producir los constructos colaboradores
 25 del miARN objetivo de la GP RC7x3 - RC12x3: dHgp6-mut1-RC7x3; dHgp6-mut1-RC8x3; dHgp6-mut1-RC9x3;
 dHgp6-mut1-RC10x3; dHgp6-mut1-RC11x3; y dHgp6-mut1-RC12x3.

[0071] *Construcción de colaboradores que contienen secuencias del miARN objetivo de hebra negativa en 3'.* Se
 construyeron colaboradores adicionales que proporcionaban las secuencias objetivo para la acción del miARN
 30 celular en el ARN intermedio replicativo de hebra negativa. Se diseñó un cebador directo específico para la
 secuencia miR-19 (miR-19 (SphI) F (ID. SEC. N°: 5)) para que codificara para un sitio de restricción SphI único. Se
 diseñó un cebador inverso específico para let-7 (let-7 RC (PmeI) R (ID. SEC. N°: 6)) con un sitio de restricción PmeI
 único. La amplificación mediante PCR con estos cebadores dio como resultado un producto de 155 pb. El producto
 de la PCR se digirió con las enzimas de restricción SphI y PmeI y se ligó en el ADN de dHcap6-mut1(W-stop)RC1-6
 35 y de dHgp6-mut1-RC1-6 linealizado con SphI y PmeI. Los colaboradores resultantes (dHcap6-mut1(W-stop)RC1-6-
 NS y dHgp6-mut1-RC1-6-NS) generaron las secuencias del miARN objetivo en el ARN intermedio replicativo de
 hebra negativa.

[0072] *Construcción de colaboradores que contienen secuencias del miARN objetivo de hebra positiva y negativa
 en 5'.* Se construyeron colaboradores que contenían las secuencias del miARN objetivo (1 - 6) en la región no
 40 codificante en 5' (NCR) de estos ARNs, de forma que los objetivos estarían presentes en el ARN de hebra positiva o
 en el de hebra negativa (Figura 2). Había presente un sitio de restricción RsrII único inmediatamente en 5' del gen
 estructural en el plásmido colaborador dHcap6-mut1(W-stop) y se usó para generar estos constructos. Se diseñaron
 cebadores directos (let-7 RC (RsrII) F (5'-TTTCGGTCCGAACCTATACAACCTAC-3' (ID. SEC. N°: 34))) e inversos
 45 (miR-19 RC (RsrII) R (5'-TTTCGGACCGTGTGCAAATCTATGC-3') (ID. SEC. N°: 33)) para codificar para los sitios
 de restricción RsrII para amplificar el casete de los miARN 1 - 6. El producto de la PCR de 155 pb se digirió con la
 enzima de restricción RsrII y se ligó en el ADN de dHcap6-mut1(W-stop) linealizado con la enzima RsrII. La
 orientación del producto de la PCR miARN 1 - 6 fue determinada mediante el análisis de la secuencia, y se
 obtuvieron clones con el fragmento de los miARN 1 - 6 únicamente en la orientación inversa (ARN de hebra
 50 negativa). Estos clones se denominaron dHcap6-mut1(W-stop)-5'RC1-6-NS. Para generar colaboradores con los
 miARN 1 - 6 objetivo en 5' de los genes estructurales en el ADN de hebra positiva se requerían etapas adicionales.
 En primer lugar, el sitio de restricción RsrII en 5' introducido cuando se produjo el constructo de hebra negativa se
 mutó a un sitio de restricción BglII único (cebador: RsrII → Bgl II mut; (5'-
 GACATTGGAAGATCTTGTGCAAATCTATG-3' (ID. SEC. N°: 35))) mediante el uso de una mutagénesis dirigida
 55 (Stratagene; La Jolla, CA), dando como resultado un colaborador denominado dHcap6-mut1(W-stop)- 5'BglII-RC1-6-
 NS. A continuación se diseñaron los cebadores para la amplificación de la secuencia de los miARN 1 - 6 objetivo de
 hebra positiva con un sitio de restricción BglII en 5' y un sitio de restricción RsrII en 3' (let-7 RC (Bgl II) F (5'-
 GGAGATCTCGAACCTATACAACCTAC-3' (ID. SEC. N°: 36)); y miR-19 RC (RsrII) R (ID. SEC. N°:33)). El producto de
 la amplificación de 147 pb se digirió con las enzimas de restricción BglII y RsrII y se purificó en gel. Después se
 60 digirió el ADN del dHcap6-mut1(W-stop)-5'BglII-RC1-6-NS con BglII y RsrII para eliminar los miARN con orientación
 de hebra negativa y el fragmento de miARN objetivo de hebra positiva clonado en su lugar. El colaborador que
 expresaba el miARN objetivo en el ARN de hebra positiva se denominó dHcap6-mut1(W-stop)-5'RC1-6.

[0073] *Construcción de colaboradores que contienen secuencias del miARN objetivo de hebra positiva y negativa
 en 5' y en 3'.* Se construyó un colaborador de la cápside que codificaba para los miARN 1-6 objetivo en las dos

posiciones de la UTR en 5' y en 3' en el molde de ARN de hebra positiva (Figura 3). Para llevar esto a cabo se digirió el ADN colaborador dHcap6-mut1(W-stop)-5'RC1-6 con las enzimas de restricción SphI y NotI para liberar la secuencia natural UTR en 3'. El ADN colaborador dHcap6-mut1(W-stop)RC1-6 se digirió con las enzimas de restricción SphI y NotI y el fragmento UTR en 3' (aprox. 270 pb) que contenía los miARN 1 - 6 objetivo se purificó en gel. El dHcap6-mut1(W-stop)-5'RC1-6 ADN linealizado se ligó con el fragmento de los miARN 1 - 6 en la UTR en 3', y el colaborador resultante se denominó dHcap6-mut1(W-stop)-5' & 3'RC1-6 ADN.

[0074] *Construcción de miARN objetivo colaboradores de la cápside de escisión deficiente.* Se usó una mutagénesis dirigida para introducir un residuo de glicina (G) en lugar del residuo de histidina (H) en el aminoácido 152 (m152) de la proteína de la cápside en los constructos de miARN objetivo colaboradores de la cápside (cebadores: Cap 152 G F (5'-GTTATTCAGGCCGATGGGTGTGGAAGGCAAGATCG-3' (ID. SEC. N°: 37)); y Cap 152 G R (5'-CGATCTTGCCTTCCACACCCATCGGCCTGAATAAC-3' (ID. SEC. N°: 38))). Se secuenció el gen m152 de la cápside para asegurar que no se introducían otras mutaciones durante la mutagénesis. Con objeto de demostrar que el cambio m152 H → G anula la función de autoproteasa de la proteína de la cápside, se introdujo la mutación m152 en la secuencia codificante de la cápside de pHCMV-Vsp (véase la Patente de EE.UU. N° 7.045.335 a favor de Smith y col.). EL ADN pHCMV-Vsp codifica para un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) que controla la transcripción del ARN dependiente de ARN de la región codificante de la proteína estructural completa del VEE (capsid-E3-E2-6K-E1). Se usó una mutagénesis dirigida para introducir la mutación m152 en la proteína de la cápside del constructo pHCMV-Vsp, generándose pHCMV-Vsp(m152). Se secuenció la región codificante del gen estructural del VEE completa en pHCMV-Vsp(m152) para asegurar que no se introducían otras mutaciones durante la mutagénesis.

[0075] *Construcción de colaboradores que contienen 9 secuencias del miARN objetivo.* Se construyeron colaboradores que contienen una copia de 9 secuencias del miARN objetivo diferentes en la región no codificante en 3' (NCR) de forma que los objetivos estarían presentes en el ARN de hebra positiva. Se combinaron los siguientes miARN objetivo en los colaboradores de la cápside y de la glucoproteína: RC1 (Let-7), RC4 (miR-101), RC5 (miR-17), RC9(miR-181), RC2 (miR-125), RC3 (miR-101), RC10 (miR-124), RC7 (miR-143) y RC12 (miR-133a). El ADN que codifica para los 9 miARN objetivo se sintetizó *de novo* con los sitios de restricción únicos SphI y PmeI modificados en los extremos 5' y 3', respectivamente. Se usaron los sitios de restricción únicos SphI y PmeI presentes inmediatamente en 3' del gen estructural de ambos plásmidos colaboradores para generar estos constructos. Los plásmidos colaboradores se linealizaron con SphI y PmeI, y los fragmentos de los 9 miARN objetivo de aproximadamente 200 pb sintetizados *de novo* fueron clonados en estos sitios. Estos plásmidos colaboradores que contienen los 9 miARN objetivo fueron identificados como (dHcap6-mut1(W-stop)mi y dHgp6-mut1 mi, respectivamente). Además, el fragmento de los 9 miARN objetivo de ~ 200 pb fue clonado en el colaborador de la cápside modificado para que codificara para la mutación por escisión en 152 de la cápside, dando como resultado la generación del colaborador dHcap6-mut1(W-stop)mi152.

[0076] *Construcción de vectores de replicón del miARN.* Se construyeron vectores de replicón que expresan el gen indicador CAT que contenían los miARN objetivo ubicados en la UTR en 3'. Los miARN objetivo se clonaron en un vector de replicón del CAT en forma de copias individuales en tándem (RC1-6), en forma de seis copias en tándem del mismo miARN objetivo (RC1x6, RC2x6, RC3x6, RC4x6, RC5x6 y RC6x6) o en forma de tres copias en tándem del mismo miARN objetivo (RC7x3, RC8x3, RC9x3, RC10x3, RC11x3 y RC12x3). El vector del replicón, pERK / 342 / EMCV / CAT, usado para todas las construcciones había sido descrito previamente (Kamrud y col., Virology 360(2):376-87 (2007)). Las secuencias del miARN objetivo para RC1x6-RC6x6 y RC7x3- RC12x3 se digirieron a partir de sus respectivos colaboradores dHcap6-mut1(W-stop)RC (descritos anteriormente) mediante el uso de las enzimas de restricción SphI y NotI. Entonces los fragmentos de los miARN objetivo liberados después de la digestión se aislaron y se ligaron en el vector del replicón pERK / 342 / EMCV / CAT linealizado con las mismas enzimas de restricción. Los vectores de replicón resultantes se denominaron pERK / 342 / EMCV / C AT-RC1-6, pERK / 342 / EMCV / CAT-RC1 x6, pERK / 342 / EMCV / C AT-RC2x6, pERK / 342 / EMCV / CAT-RC3x6, pERK / 342 / EMCV / CAT-RC4x6, pERK / 342 / EMCV / CAT-RC5x6, pERK / 342 / EMCV / CAT - RC6x6, pERK / 342 / EMCV / CAT-RC7x3, pERK / 342 / EMCV / CAT-RC8x3, pERK / 342 / EMCV / CAT-RC9x3, pERK / 342 / EMCV / CAT-RC10x3, pERK / 342 / EMCV / CAT-RC11x3 y pERK / 342 / EMCV / CAT-RC 12x3.

[0077] Se produjo un vector de replicón que expresa el gen de la gripe A / Wisconsin HA, pERK / 342 / EV71 / A(Wis) / HA, según se ha descrito previamente (Kamrud y col., Virology 360 (2): 376 - 87 (2007)). La secuencia del RC1-6 miARN se clonó en la UTR en 3' del replicón pERK / 342 / EV71 / A(Wis) / HA según se ha descrito anteriormente para los replicones del CAT de los miARN objetivo, generando un replicón denominado pERK / 342 / EV71 / A(Wis) / HA-RC1-6.

[0078] *Transcripción del ARN, electroporación y producción de la partícula de replicón del virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEE RP).* El replicón protegido y los ARNs colaboradores se transcribieron *in vitro* mediante el uso de un kit T7 RiboMax™ (Promega; Madison WI) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ARNs se purificaron mediante el uso de columnas de purificación RNeasy™ (Qiagen; Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los procedimientos usados para la producción de las vacunas del VEE RP se basaron en modificaciones de los métodos publicados (Pushko y col., Virology 239 (2): 389 - 401 (1997)). Se electroporaron

células Vero (8×10^7) suspendidas en 0,6 ml de PBS (GIBCO) con 30 μg de ARN del replicón, 20 μg del ARN colaborador de la cápside y 60 μg del ARN colaborador de la GP mediante el uso de un Bio-Rad Gene Pulser (Bio-Rad; Hercules, CA). Cuando se usaron colaboradores o replicones de los miARN objetivo para generar las VEE RP, se incluyeron inhibidores del miARN en la electroporación. Los inhibidores del miARN eran oligonucleótidos de ARN modificados en 2'-O-metilo con la secuencia complementaria inversa (RC) a la del miARN objetivo (Eurogentec; San Diego CA). A las células se les aplicaron pulsos cuatro veces con el electroporador establecido a 580 voltios y 25 μF . Las suspensiones de células electroporadas se sembraron en frascos rotatorios que contenían medio exento de suero y se incubaron a 37 °C en un 5 % de CO_2 durante 16 - 24 horas. Las VEE RP se recogieron del fluido del cultivo y se midió el título infeccioso de la preparación de las VEE RP mediante un IFA específico de antígeno y se ensayaron en un ensayo de efecto citopático (CPE) para asegurar la ausencia de virus de replicación competente detectables. Las VEE RP generadas con un vector de replicón que contiene los miARN objetivo se valoraron en células Vero electroporadas con los inhibidores de miARN para permitir que el vector del replicón fuera replicado sin impedimentos por los miARNs celulares. Las VEE RP se formularon en albúmina sérica humana (1 %) y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

[0079] ELISA del IFA y del CAT. Se cuantificó la expresión del CAT mediante un ELISA mediante el uso de lisados de células infectadas con las VEE RP con el replicón del CAT del miARN objetivo y un kit de ELISA del CAT disponible comercialmente (Boehringer Mannheim; Indianapolis, IN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todos los tipos celulares analizados estaban infectados con las VEE RP a una multiplicidad de infección (MOI) = 1 basándonos en las copias de los genomas en lugar de en las unidades infecciosas (UI). Los lisados celulares se produjeron 18 horas después de la infección, y se determinó la concentración total de proteínas para cada muestra mediante el uso de un kit de proteínas BCA (Pierce; Rockford, IL). La expresión del CAT también se detectó mediante un ensayo de inmunofluorescencia (IFA) mediante el uso de un anticuerpo de conejo anti-CAT (Cortex Biochem Inc.; San Leandro, CA). Las células transfectadas con el ARN del replicón y los ARNs colaboradores también fueron analizadas mediante un IFA mediante el uso de anticuerpo de cabra anti-nsP2 (para el replicón), anticuerpo de cabra anti-cápside y anticuerpo de cabra anti-GP. Todas las células para el análisis mediante IFA se fijaron con metanol y se inspeccionaron mediante el uso de un microscopio de fluorescencia ultravioleta Nikon Eclipse TE300.

[0080] Análisis Northern. Se realizó un análisis Northern sobre el ARN celular total recogido a partir de las células infectadas por las VEE RP. Se recogió el ARN celular total a partir de las células 16 horas después de la infección mediante el uso de columnas de aislamiento del ARN total SV Total (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN fue cuantificado mediante absorción UV y se analizaron 3 μg de cada uno en geles de glioxal agarosa al 1 % antes de ser transferidos a una membrana BrightStar-Plus (Ambion; Austin, TX) mediante transferencia pasiva. El ARN se reticuló mediante UV con la membrana, se bloqueó con una solución UltraHyb (Ambion) durante 1 hora a 45 °C, y se sondeó durante una noche con una solución UltraHyb que contenía sondas de ARN biotiniladas específicas para los genes nsP2, de la cápside o de la GP a 65 °C. Después de una hibridación durante una noche, el transferido se procesó para una detección del ARN quimioluminiscente mediante el uso de un kit BrightStar BioDetect (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante, y una visualización tras la exposición a una película autorradiográfica (Kodak; Rochester NY).

[0081] Análisis de las VEE RP mediante una PCR de transcripción inversa cuantitativa (RTqPCR). Para determinar el número de genomas equivalentes presentes en cada preparación de VEE RP con replicón del CAT en los miARN-objetivo, se realizó un protocolo estándar de RT-qPCR de una etapa en un sistema de detección de la secuencia Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems; Foster City, CA). La amplificación fue detectada mediante una sonda fluorogénica diseñada para hibridar con una región del gen nsP2 del replicón entre los dos cebadores. Se unió un colorante indicador en 5' (6-FAM) y un colorante inactivador en 3' (BHQ-1) a la sonda. La proximidad de los colorantes indicador e inactivador dio como resultado la supresión de la fluorescencia indicadora antes de la amplificación. Tras la amplificación exitosa de la región objetivo, la actividad de exonucleasa en 5' de la polimerasa de ADN liberó el colorante indicador de la sonda hibridada, dando como resultado una señal fluorescente. Se usó el ARN del replicón de las VEE purificado para generar una curva estándar en el ensayo, y se midió la señal fluorescente de cada muestra de VEE RP hasta 40 ciclos de PCR y se comparó con la señal fluorescente de los patrones para determinar los equivalentes genómicos.

[0082] Vacunación de ratones y recolección de muestras. Estudio con ratones 1: se inmunizaron ratones hembra BALB/c de 6 - 8 semanas de edad (Charles River Laboratory; Kingston, NY) con 1×10^6 UI de las VEE RP que expresan el gen de la gripe A/Wisconsin HA que fueron producidas mediante el uso de combinaciones de colaboradores de miARN objetivo y vectores de replicón (Tabla 5). Los ratones se inmunizaron a las 0 y 3 semanas mediante una inyección subcutánea (SC) en la almohadilla de la pata trasera. Se monitorizaron las respuestas de los linfocitos T y de los anticuerpos específicas para el HA de la gripe 1 semana después de cada inmunización. Se recogió sangre mediante inyecciones retroorbitales en todos los grupos. Se sacrificaron ocho (8) ratones de cada grupo 1 semana después de cada inmunización y se recogieron los esplenocitos de los animales individuales para un análisis de los linfocitos T.

[0083] Estudio con ratones 2: se inmunizaron grupos de seis (6) ratones hembra BALB/c de 6 - 8 semanas de edad (Charles River Laboratory) con 5×10^6 UI de las VEE RP que expresan el gen gD del virus herpes simple de

tipo II que fueron producidas mediante el uso de combinaciones de colaboradores de miARN objetivo y vectores de replicón (Tabla 6). Los ratones se inmunizaron a las 0 y 3 semanas mediante una inyección subcutánea (SC) en la almohadilla de la pata trasera. Se recogió sangre mediante inyecciones retroorbitales en todos los grupos una semana después de la segunda vacunación.

5

[0084] *Ensayo de neutralización de las VEE RP.* El suero usado para complementar el medio y todas las muestras de suero de los ratones ensayadas fueron inactivados térmicamente a 56 °C durante 30 minutos. Se sembraron células Vero placas de cultivo celular de 96 pocillos y se incubaron a 37 °C, con un 5 % de CO₂ durante una noche. Las muestras de suero se diluyeron a 1:10 en tubos Titertek de 96 pocillos con EMEM que contenía 1 x NEAA, 1 x PenStrep Fungizone y un 5 % de FBS inactivado térmicamente. Las muestras se diluyeron adicionalmente sucesivamente a 1:2 en EMEM para alcanzar los puntos finales de la neutralización. Se añadió un volumen igual de GFP VEE RP a cada uno de los pocillos de dilución de suero y se incubaron a 4 °C durante una noche. Después de una noche de incubación se transfirieron 100 µl de cada mezcla de suero / GFP VEE RP a pocillos de células en placas de 96 pocillos. Las placas se incubaron a 37 °C, con un 5 % de CO₂ durante 1 hora y después la mezcla de sueros / VEE RP se retiró de cada pocillo y se sustituyó por 100 µl de medio EMEM reciente. Las placas se incubaron entonces a 37 °C, con un 5 % de CO₂ durante una noche. Después de una incubación de una noche los medios se retiraron de las placas y cada placa se aclaró una vez con PBS. Se contó el número de células positivas para GFP en los pocillos de control para determinar un valor de corte al 80 %. La última dilución de cada muestra de suero en el que el recuento celular positivo en GFP era menor del valor de corte del 80 % se consideró el título de neutralización al 80 % de las VEE RP.

[0085] *ELISA del HA.* Para el análisis mediante ELISA del HA, se crearon diluciones de los sueros a partir de los ratones vacunados con las VEE RP en PBS que contenía un 1 % de BSA y un 0,05 % de Tween-20, comenzando con 1:40 seguido de dos diluciones dobles hasta 1:2.560. Las muestras tomadas previamente se diluyeron hasta sólo el 1:40. Las placas de ELISA (Nunc; Rochester, NY), que habían sido recubiertas con antígeno A / Wisconsin HA recombinante (50 ng/pocillo) (Protein Sciences Inc, Meriden, CT) en tampón de carbonato / bicarbonato (Sigma-Aldrich; St.Louis, MO) durante una noche a 4 °C, se incubaron con 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo (PBS, 3 % de BSA) a 30 °C durante 1 hora. Las placas bloqueadas se lavaron tres veces con 200 µl de PBS. Se añadieron cincuenta µl de los sueros diluidos a las placas por duplicado y se incubaron a 30 °C durante una hora. Las placas se lavaron tres veces con 200 µl de PBS. A cada pocillo se añadieron 100 µl de inmunoglobulinas polivalentes anti-ratón conjugadas con fosfatasa alcalina (IgG, IgA, IgM) (Sigma) diluidas en tampón de bloqueo (1:500). Las placas con el anticuerpo secundario se incubaron durante 1 hora a la temperatura ambiente y después se lavaron tres veces con 200 µl de PBS. Las placas se desarrollaron mediante el uso de conjuntos de comprimidos de fosfato de p-nitrofenilo Fast™ (Sigma) y se leyeron a una longitud de onda de 405. Una DO₄₀₅ de 0,2 o mayor se consideró positiva.

[0086] *ELISPOT del HA.* Se aislaron esplenocitos de los animales individuales y se realizaron ensayos de puntos por enzimoimmunoabsorción de interferón gamma específico para el HA (ELISPOT) para determinar el número de linfocitos T secretores de las citocinas específicas para el antígeno. Este procedimiento ha sido descrito previamente (Reap y col., Vaccine 25 (42): 7441 - 9 (2007)).

Resultados

[0087] *Experimentos para demostrar la actividad del miARN funcional en ARNs colaboradores.* Se llevaron a cabo experimentos para determinar si los miARNs eucariotas podría ser usados para controlar / reducir la replicación / expresión del colaborador de alfavirus en las células, colocando las secuencias del miARN objetivo en las UTR en 3' de estos ARNs. Las secuencias objetivo elegidas son representativas de miARNs eucariotas conservados evolutivamente o ubicuos (Sempere y col., Genome Biol. 5 (3): R13 (2004); Baskerville and Bartel, ARN 11 (3): 241 - 7 (2005); Farh y col., Science 310 (5755): 1817 - 21 (2005)).

50

[0088] El experimento inicial fue diseñado para determinar si los miARN RC1-6 objetivo (let-7, lin-4, miR101, miR-155, miR-17, miR-19 = RC1-6 objetivo) o los subconjuntos de estos objetivos (let-7, lin-4, miR101 = objetivos RC1-3 o miR-155, miR17, miR-19 = RC4-6 objetivo) serían capaces de controlar la replicación del colaborador cuando se ubicaban en la UTR en 3' del ARN de la cadena positiva. Se electroporaron células Vero con un vector del replicón combinado con colaboradores de la cápside y de la gp con complementos emparejados del miARN objetivo en ellos. Específicamente se combinó ARN del replicón con colaboradores de la cápside y de la gp con los miARN objetivo RC1-6 en ellos o con ambos colaboradores portadores de los miARN objetivo RC1-3 en ellos, o con ambos colaboradores portadores de los miARN objetivo RC4-6 en ellos. Cada una de las combinaciones de colaborador y replicón se electroporaron en presencia y en ausencia de inhibidores del miARN (oligonucleótidos de ARN metilados en 2'-O) específicos para el complemento completo del miARN objetivo presente en los colaboradores. Además, también se combinaron las combinaciones de ARN colaborador con los miARN objetivo RC1-3 y RC4-6 con combinaciones de miARN inhibidor no emparejado, para demostrar la especificidad de los inhibidores usados. Por ejemplo, se trataron los ARNs colaboradores de los miARN RC1-3 objetivo con inhibidores del miARN específicos para los miARN RC4-6 objetivo. Las células electroporadas se sembraron en medio y se incubaron durante una noche. Después de la incubación (~ 18 horas) se recogieron las muestras para examinar la expresión de las

65

proteínas específicas de los colaboradores (inmunotransferencia Western e IFA), la replicación del ARN específica de los colaboradores (inmunotransferencia Northern) y el rendimiento de las VEE RP. Los resultados de los análisis por inmunotransferencia Western de la cápside y de la gp se muestran en la Figura 4. Los resultados de los análisis por inmunotransferencia Northern específicos de la cápside y de la gp se muestran en la Figura 5. Los rendimientos de las VEE RP producidas mediante las diferentes combinaciones de ARN colaborador del miARN objetivo se muestran en la Figura 6. El análisis para inmunotransferencia Western indicó que la expresión de la cápside y de la GP se redujo en ausencia de inhibidores del miARN específicos para el miARN objetivo presente en los colaboradores (Figura 4). La diferencia en la expresión de las proteínas era particularmente evidente para la GP. El análisis mediante la inmunotransferencia Northern indicó que los niveles de replicación del colaborador de la cápside y de la GP reflejaba las respectivas expresiones de proteínas colaboradoras en presencia o en ausencia de los inhibidores del miARN emparejados (Figura 5). La expresión relativa de la cápside y de la GP y los niveles de replicación del ARN del colaborador predijeron los rendimientos de las VEE RP producidas. Las células que no recibieron los inhibidores apropiados del miARN (específicos para el miARN objetivo de los colaboradores) produjeron entre 3 y 4,5 órdenes de magnitud menos VEE RP (Figura 6).

[0089] El experimento descrito anteriormente emparejaba el miARN objetivo de cada colaborador. Después, se lleva a cabo un experimento para determinar si podía haber presentes diferentes combinaciones de miARN objetivo en los colaboradores y todavía salvar los rendimientos de las VEE RP cuando se les suministraba la apropiada combinación de inhibidores del miARN. Se ensayaron combinaciones de un colaborador de la cápside con los objetivos RC1-3 y un colaborador de la GP con los RC4-6 (y viceversa) en presencia o en ausencia de una mezcla de los 6 inhibidores del miARN. El análisis mediante inmunotransferencia Western indicó que la expresión de la cápside y de la GP se redujo en ausencia de los inhibidores del miARN específicos para el miARN objetivo presente en los colaboradores (Figura 7). La diferencia en la expresión de proteínas en ausencia de inhibidor era más pronunciada que la apreciada cuando se emparejaba el miARN objetivo presente en los colaboradores (Figura 4). El análisis mediante inmunotransferencia Northern indicó que los niveles de replicación de los colaboradores de la cápside y de la GP reflejaban la respectiva expresión de proteínas colaboradoras en presencia o en ausencia de los inhibidores del miARN emparejados (Figura 8). Como se encontró en el experimento con colaboradores del miARN objetivo emparejados, la expresión relativa de la cápside y de la GP y los niveles de replicación del ARN colaborador predecían los rendimientos de las VEE RP producidas. Los rendimientos de las VEE RP eran de 3 órdenes de magnitud menores en las células que no recibieron los inhibidores del miARN cuando se comparaban con las que sí los recibieron (Figura 9).

[0090] *Experimentos para determinar la ubicación requerida del miARN objetivo en los ARNs colaboradores.* Para determinar si los miARN objetivo RC1-6 podrían funcionar en ubicaciones distintas a la UTR en 3' del ARN del colaborador de la cápside de hebra positiva, se construyeron colaboradores de la cápside adicionales que movían los miARN objetivo RC1-6 a la UTR en 5' del ARN del colaborador de la cápside en ambos moldes de la cadena positiva y de la cadena negativa del ARN para la replicación. Además, los miARN objetivo RC1-6 se modificaron en la UTR en 3' del molde de ARN de hebra negativa. Estos experimentos se llevaron a cabo con una combinación de ARN de replicación, ARN del colaborador de GP no modificado y uno de los ARNs colaboradores de la cápside de los miARN RC1-6 objetivo en presencia y en ausencia de inhibidores del miARN específicos para el miARN objetivo presente en los colaboradores. Las células electroporadas se sembraron en medio y se incubaron durante una noche. Después de la incubación (~ 18 horas), se recogieron muestras para examinar la expresión de las proteínas específicas del colaborador de la cápside (inmunotransferencia Western e IFA), la replicación del ARN (inmunotransferencia Northern) y el rendimiento de las VEE RP. Los resultados de los análisis Western específicos de la cápside y de inmunotransferencia Northern se muestran en la Figura 10 y en la Figura 11, respectivamente. Los rendimientos de las VEE RP producidas mediante el uso de los diferentes colaboradores de la cápside del miARN objetivo se muestran en la Figura 12. Ambos análisis de inmunotransferencia Western y Northern indicaron que el miARN objetivo funcionaba más eficazmente cuando estaba en el ARN colaborador de hebra positiva. La expresión y la replicación del colaborador se redujeron significativamente cuando el ARN de la hebra positiva era el objetivo y no se suministraban inhibidores del miARN en el momento de la electroporación de las células con el ARN. Además, el miARN objetivo tanto en una ubicación en 5' como en 3' relativa al gen de la cápside, o en ambas ubicaciones en 5' y en 3' simultáneamente, era eficaz para reducir la expresión y la replicación del ARN colaborador en ausencia de una adición de inhibidor del miARN. Como se ha apreciado en los experimentos previos, los rendimientos de las VEE RP eran de 3 órdenes de magnitud menores a los de las células que no recibían los inhibidores del miARN cuando se comparaban con las que sí los recibían (Figura 12).

[0091] *Experimentos para determinar la contribución del miARN objetivo individual sobre la replicación del ARN colaborador.* Para determinar qué efecto de cada miARN objetivo estaba contribuyendo al control global de la replicación, se clonaron seis copias de cada secuencia individual de miARN objetivo en la UTR en 3' del ARN del colaborador de la cápside de hebra positiva. Se combinaron el ARN del colaborador de la cápside y el ARN del colaborador de la GP no modificado con el ARN del replicón, y se electroporaron en células Vero en presencia o en ausencia de inhibidores del miARN específicos para el miARN objetivo presente en el colaborador de la cápside. Las células electroporadas se sembraron en medio y se incubaron durante una noche. Después de la incubación (~ 18 horas), se recogieron las muestras y se examinó la expresión de proteínas específica de la cápside (inmunotransferencia Western e IFA), la replicación del ARN (inmunotransferencia Northern) y el rendimiento de las

VEE RP. Los resultados de los análisis mediante inmunotransferencia Western y Northern se muestran en la Figura 13 y en la Figura 14, respectivamente. Estos resultados muestran que los miARN celulares específicos para let-7, miR-155, miR-17 y miR-19 (RC1, RC4, RC5 y RC6, respectivamente) son capaces de regular por disminución la expresión y la replicación del colaborador (en ausencia de un inhibidor específico del miARN) y que los miARN
 5 específicos para lin-4 (RC2) y miR-101 (RC3) son más eficaces para controlar la expresión / replicación del colaborador en este sistema de empaquetamiento de células Vero (Figura 13 y Figura 14). Los rendimientos de las VEE RP producidas mediante el uso de los diferentes colaboradores de la cápside del miARN objetivo se muestran en la Figura 15. El colaborador de la cápside que contiene los seis miARN objetivo (RC1-6) mostró la mayor
 10 diferencia en los rendimientos de las VEE RP en presencia y en ausencia de inhibidor del miARN (3 órdenes de magnitud), lo que indica el efecto aditivo del miARN objetivo sobre la replicación del colaborador en este experimento. El ómero del miARN let-7 (RC1x6) objetivo mostró el siguiente mayor efecto sobre el rendimiento de las VEE RP (~ 2,5 órdenes de magnitud), mostrando tanto el miR-155 (RC4x6) como el miR-17 (RC5x6) unas
 15 diferencias de ~ 1,5 órdenes de magnitud en el rendimiento de las VEE RP. El colaborador con seis copias del miR-19 objetivo (RC6x6) produjo aproximadamente la mitad logarítmica menos de rendimiento de las VEE RP, mientras que el lin-4 (RC2x6) y el miR-101 (RC3x6) objetivo mostraron poca diferencia en el rendimiento de las VEE RP (Figura 15). En combinación, la inmunotransferencia Western, la Northern y los datos de rendimiento de las VEE RP indican que estos miARN objetivo individuales elegidos juegan un papel mayor o menor en el efecto global del miARN sobre la replicación del colaborador en el empaquetamiento en células Vero, pero todos pueden contribuir al efecto global.

20 **[0092]** *Experimentos para determinar el número de copias requeridas del miARN objetivo en los ARNs colaboradores.* Los experimentos descritos anteriormente sugieren que cada miARN tiene un efecto diferente sobre la replicación del colaborador del miARN objetivo (y el rendimiento de las VEE RP) y que algunos miARN objetivo eran más eficaces para controlar la replicación del colaborador en células Vero que otros. Se produjeron constructos
 25 adicionales mediante el uso de un miARN objetivo que impartía un control sobre la replicación del ARN en células Vero. Se eligieron dos miARN objetivo, RC1 (let-7) y RC5 (miR-155) para estos estudios debido a que representan los miARN objetivo con un efecto fuerte e intermedio sobre la replicación del colaborador en células Vero, respectivamente. Se construyeron los nuevos colaboradores de la cápside y de la GP bien con una única copia o bien con tres copias de cada miARN objetivo individual (RC1x1, RC1x3, RC5x1 y RC5x3) modificados en la UTR en
 30 3' del ARN de la cadena positiva. Estos colaboradores se diseñaron para determinar qué número de copias del miARN objetivo se requería, para estos miARNs en particular, para impartir un control sobre la replicación del ARN en células Vero.

[0093] Se combinaron ARNs colaboradores de la cápside y de la GP, con el mismo complemento del miARN objetivo, con ARN de replicón, y se electroporaron en células Vero en presencia o en ausencia de inhibidores del miARN específicos para el miARN objetivo presente en los colaboradores. En un conjunto de electroporaciones se sustituyó el inhibidor del miARN por el oligonucleótido metilado en 2'-O- específico para el let-7 por un oligómero de fosfordiamidato morfolino (PMO) específico para el miARN de let-7, para determinar si este tipo de molécula
 40 funcionaria para bloquear la acción del miARN del let-7 en los colaboradores objetivo. Las células electroporadas se sembraron en medio y se incubaron durante una noche. Después de la incubación (~ 18 horas), se recogieron las muestras para examinar la expresión de las proteínas específicas de los colaboradores, la replicación del ARN específica de los colaboradores y el rendimiento de las VEE RP. Tan pocas como una copia del miARN objetivo let-7 o miR-155 (RC1x1 o RC5x1, respectivamente) dieron como resultado una reducción en la expresión de ambas
 45 proteínas (Figura 16 y Figura 19) y en la replicación del ARN (Figura 17 y Figura 20) de ambos colaboradores. La reducción apreciada en la expresión de las proteínas y en la replicación del colaborador era reflejada en los rendimientos de las VEE RP producidas a partir de células en ausencia del inhibidor específico (Figura 18 y Figura 21). Los colaboradores que contenían el miARN objetivo let-7 (RC1) estaban más completamente controlados (incluso con una única copia) que los colaboradores que contenían el (los) miARN miR-155 objetivo(s). Los rendimientos de las VEE RP en ausencia de un inhibidor específico del miARN se redujeron en ~ 3 órdenes de
 50 magnitud mediante el uso de colaboradores con el RC1 objetivo, independientemente del número de copias (Figura 18). Por el contrario, había una mayor reducción en los rendimientos de las VEE RP en ausencia de un inhibidor específico del miARN mediante el uso de colaboradores bien con 3 o bien con 6 copias del miARN objetivo miR-155 (5 x 3 y 5 x 6, respectivamente) que con un único miR-155 objetivo (5 x 1) (Figura 21). Estos datos indican que se requería más de una copia del miR-155 objetivo (RC5) para que tuviera un efecto similar al de una copia del let-7
 55 objetivo (RC1) para un control óptimo de la replicación del ARN en esta célula Vero. Además, el inhibidor del miARN de let-7 basado en PMO restableció la expresión de proteínas (Figura 16) y la replicación del ARN (Figura 20) a unos niveles similares al rescate apreciado para el inhibidor del miARN con el oligonucleótido metilado en 2'-O-. Los rendimientos de las VEE RP producidas en presencia de un inhibidor basado en PMO eran prácticamente de 2 órdenes de magnitud mayores que en ausencia de inhibidor, pero no tan grandes como cuando se usaban
 60 inhibidores del miARN con el oligonucleótido metilado en 2'-O- (Figura 18).

[0094] *Experimentos para demostrar la funcionalidad de los ARNs colaboradores de la cápside de escisión deficiente del miARN objetivo.* Se llevaron a cabo experimentos para demostrar que la mutación de la cápside m152
 1) bloqueaba la producción de las VEE RP cuando la mutación se introducía en el gen de la cápside en el contexto
 65 de un colaborador de ADN, y 2) cuando se introducía en un colaborador de ARN de la cápside del miARN objetivo,

provocaba poca o ninguna reducción en el rendimiento de las VEE RP, cuando se incluían inhibidores del miARN en el sistema de la célula de empaquetamiento para la producción de las VEE RP. Se electroporaron células Vero con ARN de replicón y las siguientes combinaciones de colaborador 1) pHCMV-Vsp, 2) pHCM-Vsp(m152), 3) dHcap6-mut1(W-stop)m152 y dHgp6-mut1,4) dHcap6- mut1(W-Stop)m152 RC4-6 y dHgp6-mut1 y 5) dHcap6-mut1(W-Stop)m152 RC4-6 y dHgp6-mutl más inhibidores del miARN específicos para los RC4-6. Los rendimientos de las VEE RP producidas a partir de cada una de estas combinaciones se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: producción de VRP con constructos colaboradores de escisión deficiente.

Combinación de ARN	Colaborador de la cápside	Colaborador de la GP	Inhibidor añadido	VRP/ml
1	pHCMV-Vsp	NA	no	7,2E + 07
2	pHCM-Vsp(m152)	NA	no	0
3	dHcap6-mut1(W-stop)m 152	dHgp6-mutl	no	7,9E + 08
4	dHcap6-mut1(W-Stop)m152 RC4-6	dHgp6-mutl	no	1,4E + 06
5	dHcap6-mut1(W-Stop)m152 RC4-6	dHgp6-mutl	si	8,6E + 08

- 10 **[0095]** Los datos indican que el cambio H → G en el aminoácido 152 de la proteína de la cápside bloquea la producción de las VEE RP cuando la mutación está en el contexto de un colaborador de ADN; en este contexto, la cápside dependería de la función de autoproteasa para escindirse a sí misma a partir de las glucoproteínas de VEE traducidas conjuntamente (compárense las combinaciones de ARN 1 y 2). Por el contrario, si la mutación m152 se introduce en un colaborador de la cápside ARN (en el que no se requiere actividad de autoproteasa) se producen las VEE RP (combinación de ARN 3). Adicionalmente, la introducción de m152 en el colaborador de la cápside del miARN objetivo tampoco tiene un efecto negativo sobre el rendimiento de las VEE RP siempre que se añada inhibidor del miARN a la mezcla de electroporación (compárense las combinaciones de ARN 4 y 5).

- [0096]** Experimentos para la determinación de la especificidad del tipo celular de la actividad del miARN sobre la replicación del ARN de alfavirus. Todos los experimentos previos se han llevado a cabo en células Vero. Para determinar si el miARN objetivo que hemos ensayado en células Vero tiene la misma función en otros tipos de células, se construyeron vectores de replicón que expresan el gen indicador CAT que codifica para tres o seis copias de cada miARN objetivo individual (por ejemplo, pERK / 342 / EMCV / CAT-RC1x6, pERK / 342 / EMCV / CAT-RC2x6, pERK / 342 / EMCV / CAT-RC7x3, etc.). Las preparaciones de VEE RP se prepararon mediante la electroporación de células Vero, en presencia del pertinente inhibidor del miARN, con cada uno de los ARNs de replicón del CAT del miARN objetivo combinados con ARNs de colaboradores de la cápside y de la GP no modificados. Para eliminar dificultades en la determinación de los títulos precisos de unidades infecciosas (IU) en las células Vero de estas preparaciones de VEE RP (debido al efecto de los miARNs presentes en las células Vero, que reducen el título efectivo IU), se determinaron los equivalentes genómicos (GE) de replicón mediante una PCR de transcriptasa inversa cuantitativa. Los títulos de los equivalentes genómicos se usaron para controlar la multiplicidad de infección (MOI) para cada uno de los tipos celulares analizados. La MOI usada era de 3 - 5 en cada uno de estos experimentos. Un resumen de la actividad relativa del miARN detectada en cada tipo celular, basada en el porcentaje de CAT expresada a partir de cada uno de los replicones del miARN objetivo con respecto a un replicón de CAT no modificado, se muestra en la Tabla 3 y en la Tabla 4.

Tabla 3: actividad del microARN en diversos tipos de células (RC 1 - 6).

Tipo de célula	Ser humano						Hámster		NHP	Bov.	Ratón
	Músculo			Pulmón	Musc.	Hep.	Riñón	Ovario	Riñón		Neurona
Nombre de la célula	HEL-299	RD	MO-59K	MRC -5	SkM	PHH	BHK	CHO	Vero	BT	CN
Replicón (miARN)	Expresión relativa del CAT en % frente al replicón de CAT de control										
CAT (ninguno)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
CAT (RC1-6)	0	5	0	1	nt	nt	1	0	0	nt	nt
CAT (RC1xd)	0	20	0	0	1	0	0	0	0	0	6
CAT (RC2x6)	3	20	15	4	11	11	31	1	42	8	59
CAT (RC3x6)	26	41	50	49	38	0	86	36	37	50	70
CAT (RC4x6)	13	52	46	57	42	32	81	66	11	55	100
CAT (RC5x6)	7	0	6	35	14	0	13	0	1	18	2
CAT (RC6x6)	11	8	28	45	30	0	60	8	14	32	74

Tabla 4: actividad del microARN en diversos tipos de células (RC 7 - 12)

Tipo de célula	Ser humano		Ratón	NHP
	Músculo		Neurona	Riñón
Nombre de la célula	RD	SkM	CN	Vero
Replicón (miARN)	Expresión relativa del CAT en % frente al replicón de CAT de control			
CAT (ninguno)	100	100	100	100
CAT (RC7x3)	49	10	80	55
CAT (RC8x3)	2	6	39	4
CAT (RC9x3)	3	6	1	32
CAT (RC10x3)	100	31	46	54
CAT (RC11x3)	15	100	100	100
CAT (RC12x3)	11	54	17	100

[0097] Las VEE RP generadas con un replicón de CAT portador de los seis miARN objetivo (CAT 1 - 6) expresó muy poca proteína CAT en cualquiera de los tipos de células ensayados. De forma similar, podía detectarse una mínima proteína CAT en las células infectadas con las VEE RP que contenían un ARN de replicón portador del miARN objetivo D let-7 (CAT RC1x6). Estos resultados demuestran que el miARN de let-7 está presente en todos los tipos de células ensayados. Los niveles de proteína CAT detectados en las células infectadas con los otros replicones de CAT de los miARN objetivo individuales indicaban un abanico de expresión proteica. Estos datos muestran que cada diferente tipo de célula tiene un complemento diferente de los miARNs activos disponibles para controlar la replicación del ARN del replicón.

[0098] *Experimentos para determinar la actividad in vivo del miARN sobre la replicación del ARN del alfavirus.* Los datos descritos anteriormente indican que los ARNs del colaborador del miARN objetivo y del replicón pueden ser controlados mediante la acción de los miARNs celulares en un amplio conjunto de células en cultivo (*in vitro*). Para determinar si el mismo control del miARN demostrado *in vitro* podía demostrarse *in vivo*, se produjeron varias de las preparaciones de VEE RP y se ensayaron en ratones BALB/c. Se mezclaron combinaciones de ambos colaboradores del miARN objetivo con vectores de replicón no modificados o del miARN objetivo que expresan el gen de la gripe HA (A/Wisconsin). Se muestra un resumen de las combinaciones de ARN de colaborador y de replicón en la Tabla 5.

Tabla 5: resumen de las combinaciones de ARN de colaborador y de replicón.

Identificador de grupo	ARN del replicón	Colaborador de la cápside	Colaborador de la GP
Natural ("WT")	pERK / 342 / EV71 / A(Wis) / HA	dHcap6-mut1 (W-stop)	dHgp6-mut1
miCap	pERK / 342 / EV71 / A(Wis) / HA	dHcap6-mut1 (W-stop)RC1-6	dHgp6-mut1
miGP	pERK / 342 / EV71 / A(Wis) / HA	dHcap6-mut1 (W-stop)	dHgp6-mut1-RC1-6
miCap + miGP	pERK / 342 / EV71 / A(Wis) / HA	dHcap6-mut1(W-stop)RC1-6	dHgp6-mut1-RC1-6
miRep + miCap + miGP	pERK / 342 / EV71 / A(Wis) / HA-RC1-6	dHcap6-mut1(W-stop)RC1-6	dHgp6-mut1-RC1-6

[0099] Se inmunizaron grupos de 16 ratones con dosis equivalentes de cada una de las VEE RP. Siete días después de la dosis de sensibilización, se sacrificó la mitad (8) de los ratones, se recogieron los esplenocitos y se llevó a cabo un análisis de ELISPOT de interferón gamma específico para el HA. Los resultados de los análisis de ELISPOT específicos para el HA de los 7 días posteriores a la sensibilización se muestran en la Figura 22. Había significativamente menos células formadoras de puntos (SFCs) en el grupo inmunizado con las VEE RP generadas con los ARNs de replicón y de colaborador del miARN ("miRep + miCap + miGP") que en los grupos inmunizados con las VEE RP generadas con los ARNs de replicón y de colaborador no modificados ("WT") o con las VEE RP generadas con ARN de replicón y colaboradores de la cápside y de la GP de miARN objetivo no modificados ("miCap + miGP"). Tres semanas después de la dosis de sensibilización, el resto de los ratones de cada grupo se revacunaron con sus respectivas VEE RP de HA. Siete días después de la revacunación, el resto de los animales se sacrificó y se recogieron los esplenocitos para un análisis de ELISPOT de interferón gamma específico para el HA. Los análisis mediante ELISPOT específicos para el HA posteriores a la revacunación se muestran en la Figura 23. Después de la revacunación, los SFCs detectados en el grupo inmunizado con las VEE RP generadas mediante el uso de los ARN del replicón del miARN objetivo era significativamente menores que los detectados en todos los demás grupos inmunizados con las VEE RP. Adicionalmente, el análisis mediante ELISA específico para el HA de las muestras de suero posteriores a la sensibilización (Figura 24) y posteriores a la revacunación (Figura 25) demostró que los animales inmunizados con las VEE RP generadas con un replicón del miARN objetivo eran significativamente menores que todos los demás grupos inmunizados con las VEE RP. Estos datos demuestran que

las VEE RP del replicón del miARN-objetivo eran significativamente inhibidas de inducir una respuesta inmunitaria específica celular o humoral frente al HA.

[0100] Se llevó a cabo un segundo estudio con ratones mediante el uso de las VEE RP generadas con ARNs de colaboradores del miARN objetivo. Se diseñó un complemento diferente del miARN objetivo en la UTR en 3' de los colaboradores de ARN usados en este estudio. Los ARNs de los colaboradores de la cápside y de la gp contenían los siguientes miARN objetivo: RC1, RC4, RC5, RC9, RC2, RC3, RC10, RC7 y RC12 (5'-gcatgcaactatacaacactactacctcaccctatcacgattagcattaactacctgcactgtaagcactttgactcaccgac agcgttgaatgttacacagtcgaaggtctcagggacttcagttatcacagtactgtaggcattcaccgctgccttagagcta cagtgtctcatctcacagctggtgaagggaccacaaagtttaaac-3' (ID. SEC. N°: 39)). Se empaquetó un vector de replicón que expresa el gen gD del virus del herpes simple II (HSV gD) en las VEE RP con 4 complementos diferentes de ARNs colaboradores según se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: combinaciones de ARN de replicón y de colaborador usadas para generar las VRP del HSV.

Identificador de grupo	ARN de replicón	Colaborador de la cápside	Colaborador de la GP
Natural	pAVPI HSV	dHcap6-mut 1 (W-stop)	dHgp6-mut1
152	pAVPI HSV	dHcap6-mut1(W-stop)152	dHsp6-mut1
mi	pAVPI HSV	dHcap6-mut1 (W-stop)mi	dHgp6-mut1 mi
mi152	pAVPI HSV	dHcap6-mut1 (W-stop)mi152	dHgp6-mut1 mi

[0101] Se inmunizaron grupos de 6 ratones con 5×10^6 UI de cada una de las VEE RP a las 0 y a las 3 semanas. No se apreció diferencia en las respuestas humorales o celulares específicas para el gD del HSV detectadas en los animales inmunizados con las VEE RP del HSV empaquetado con las diferentes combinaciones de ARN colaborador. También se determinó la respuesta inmunitaria anti-VEE RP, denominada también "respuesta anti-vector", desencadenada los animales vacunados. Los resultados de los ensayos de neutralización de las VEE RP llevados a cabo en los sueros recogidos a partir de los animales vacunados se muestran en la Figura 26. Los animales vacunados con las VEE RP generadas con los ARNs colaboradores del miARN objetivo mostraron unos títulos de neutralización anti-VEE RP menores que los animales vacunados con las VEE RP generadas con los ARNs colaboradores que no codificaban para el miARN objetivo. Estos datos indican que es posible reducir las respuestas inmunitarias antivector mediante el empaquetamiento de las VEE RP con ARNs colaboradores del miARN objetivo.

[0102] Tomados conjuntamente, los dos estudios en ratones presentados anteriormente indican que la inhibición específica del miARN objetivo de la replicación tanto del ARN del replicón como del colaborador se produce *in vivo*. Estos resultados concuerdan completamente con la inhibición específica del miARN objetivo que fue demostrada *in vitro* en ausencia de inhibidores del miARN. Los datos *in vitro* e *in vivo* presentados anteriormente demuestran que el diseño del miARN objetivo en ARNs colaboradores de alfavirus controla la replicación / expresión de estos ARNs en células en las que la función colaboradora no es necesaria o deseada.

35 Eficacia de las VRP creadas con colaboradores de miARN objetivo en primates no humanos

[0103] Se construyeron vectores de replicón mediante el uso del gen L1R del virus de vaccinia (VACV), que es un homólogo de un gen similar en la viruela. Se usaron dos sistemas de vector de alfavirus vector diferentes: "pVEK" que deriva de TC83, y "pERK" que deriva de la cepa de VEE atenuada V3014. El gen L1R se modificó para que incluyera una secuencia de señalización TPA que mejora la inmunogenicidad del constructo. Las VEE RP que expresan el L1R se generaron mediante el uso de colaboradores del miARN objetivo (descritos anteriormente en este documento como dHcap6-mut1(W-stop)mi152 y dHgp6-mut1mi).

[0104] Se vacunaron grupos de cinco macacos cinomólogos por vía intramuscular en la semana 0 y 28 como sigue: Grupo 1, 5×10^7 UI de pVEK L1R-VRP; Grupo 2, una combinación de $2,5 \times 10^7$ UI de pVEK L1R-VRP y $2,5 \times 10^7$ UI de pERK L1R VRP; y grupo 3, 5×10^7 UI de pVEK L1R-VRP. Se recogieron muestras de suero y de PBMC de los animales el día 0, el 21 (sensibilización), el 35 (1 semana PR) y el 56 (4 semanas PR). Los resultados se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7: resumen de los resultados para macacos cinomólogos vacunados

Grupo	Vacuna de VRP	Log de GMT ELISA			PRNT ₅₀ ^b GMT ^b	Media de los SFC específicos para L1R ^c		
		sensibilización	1 semana PR ^a	4 semanas PR		sensibilización	1 semana PR ^a	4 semanas PR
1	pVEK L1R	3,4	5,6	5,0	183,8	12	109	155

Grupo	Vacuna de VRP	Log de GMT ELISA			PRNT ₅₀ ^b GMT ^b	Media de los SFC específicos para L1R ^c		
		sensibilización	1 semana PR ^a	4 semanas PR		sensibilización	1 semana PR ^a	4 semanas PR
2	pVEK L1R + pERK L1R	3,8	5,1	4,2	211,1	9	34	18
3	pERK L1R	3,5	5,1	4,6	139,3	15	24	59

^a PR = posterior a la revacunación
^b título medio geométrico de anticuerpos neutralizantes de VacV
^c por 10⁶ PBMC (se ha restado el fondo)

[0105] Las respuestas inmunitarias detectadas en estos macacos eran coherentes con las respuestas detectadas previamente en los animales que recibieron una mezcla de VEE RP que expresan L1R y otras 3 VEE RP que expresan el gen VACV en un estudio de exposición en el que los macacos vacunados estaba significativamente protegidos de la enfermedad mortal. Estos datos indican que las VRP generadas con los colaboradores del miARN objetivo son inmunógenas en primates no humanos.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 **[0106]**

<110> ALPHAVAX, INC.

<120> USO DE MICROARN PARA CONTROLAR LOS ÁCIDOS NUCLEICOS COLABORADORES DE VIRUS

15

<130> 23550-0002WO1

<150> US 61/118.954

<151> 01-12-2008

20

<160> 39

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

25

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 1

ttaatcgcac tcactatag 19

35

<210> 2

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 2

45

ttgcatgcc ttcagttatc acagtactgt a 31

<210> 3

<211> 31

<212> ADN

50

<213> Secuencia artificial

<220>

	<223> Construcción sintética	
	<400> 3	
5	ttgcatgca cacagtcgaa ggtctcaggg a	31
	<210> 4	
	<211> 33	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 4	
15	catgcatgca ctacctgcac tgtaagcact ttg	33
	<210> 5	
	<211> 32	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 5	
25	catgcatgct cagtttgca tagattgca ca	32
	<210> 6	
	<211> 33	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
35	<400> 6	
	ggggttaaa ctgaggtagt aggttgata gtt	33
	<210> 7	
40	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Construcción sintética	
	<400> 7	
	ggggttaaa ctccctgaga ccttcgactg tgt	33
50	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Construcción sintética	
	<400> 8	
60	taagagccgc gagcgcct	20
	<210> 9	
	<211> 32	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 9		
5	gggtttaaac ttaatgctaa tcgtgatagg gg	32	
	<210> 10		
	<211> 34		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Construcción sintética		
	<400> 10		
15	gggtttaaac caaagtgctt acagtgcagg tagt	34	
	<210> 11		
	<211> 22		
20	<212> ADN		
	<213> <i>Homo Sapiens</i>		
	<400> 11		
25	aactatacaa cctactacct ca	22	
	<210> 12		
	<211> 22		
	<212> ADN		
30	<213> <i>Homo Sapiens</i>		
	<400> 12		
	acacagtcga aggtctcagg ga	22	
	<210> 13		
35	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo Sapiens</i>		
	<400> 13		
40	cttcagttat cacagtactg ta	22	
	<210> 14		
	<211> 22		
	<212> ADN		
45	<213> <i>Homo Sapiens</i>		
	<400> 14		
	cccctatcac gattagcatt aa	22	
50	<210> 15		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo Sapiens</i>		
	<400> 15		
55	actacctgca ctgtaagcac tttg	24	
	<210> 16		
	<211> 23		
60	<212> ADN		
	<213> <i>Homo Sapiens</i>		
	<400> 16		
65	tcagtttgc atagatttgc aca	23	

<210> 17
 <211> 155
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 17
 10
 gcatgcaact atacaaccta ctacctcaac acagtcgaag gtctcagga cttcagttat 60
 cacagtactg tagatatccc cctatcacga ttagcattaa actacctgca ctgtaagcac 120
 tttgtcagtt ttgcatagat ttgcacagtt taaac 155
 <210> 18
 <211> 72
 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 20
 <400> 18
 gcatgcaact atacaaccta ctacctcaac acagtcgaag gtctcagga cttcagttat 60
 cacagtactg ta 72
 25
 <210> 19
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 19
 cccctatcac gattagcatt aaactacctg cactgtaagc actttgtcag tttgcatag 60
 atgtgcacag tttaaac 77
 35
 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 40
 <213> *Homo Sapiens*
 <400> 20
 gagctacagt gcttcatctc a 21
 45
 <210> 21
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*
 50
 <400> 21
 agctgagtg aggatgtta ca 22
 <210> 22
 <211> 23
 55
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*

ES 2 525 707 T3

<400> 22
 actcaccgac agcgttgaat gtt 23

5 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*

10 <400> 23
 ggcattcacc gcgtgcctta 20

15 <210> 24
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*

20 <400> 24
 atacatactt cttacattc ca 22

25 <210> 25
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*

30 <400> 25
 cagctggtg aaggggacca aa 22

35 <210> 26
 <211> 125
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

40 <400> 26
 gcgtttaaac tgagatgaag cactgtagct ctgagatgaa gcactgtagc tctgagatga 60
 agcactgtag ctcgcatgct taccattgct cgcagttctc cggagtatac ttcacggtaa 120
 ctccc 125

45 <210> 27
 <211> 128
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 27
 gcgtttaaac tgtaaaccac ctacactcag cttgtaaaca tcctacactc agcttgtaa 60
 catcctacac tcagctgcat gcttaccatt gctcgcagtt ctccggagta tacttcacgg 120
 taactccc 128

55 <210> 28
 <211> 131
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

ES 2 525 707 T3

<400> 28

```
gcgtttaaac aacattcaac gctgctgggtg agtaacattc aacgctgtcg gtgagtaaca 60
ttcaacgctg tcggtgagtg catgcttacc attgctcgca gttctccgga gtatacttca 120
cggtaactcc c 131
```

5 <210> 29
<211> 122
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 29

```
gcgtttaaac taaggcacgc ggtgaatgcc taaggcacgc ggtgaatgcc taaggcacgc 60
ggtgaatgcc gcatgcttac cattgctcgc agttctccgg agtatacttc acggtaactc 120
cc 122
```

15 <210> 30
<211> 128
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

25 <400> 30

```
gcgtttaaac tggaatgtaa agaagtatgt attggaatgt aaagaagtat gtattggaat 60
gtaaagaagt atgtatgcat gcttaccatt gctcgcagtt ctccggagta tacttcacgg 120
taactccc 128
```

30 <210> 31
<211> 128
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 31

```
gcgtttaaac tttggtcccc ttcaaccagc tgtttggtcc ccttcaacca gctgtttggg 60
ccccctcaac cagctggcat gcttaccatt gctcgcagtt ctccggagta tacttcacgg 120
taactccc 128
```

40 <210> 32
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Construcción sintética

<400> 32
50 cctcggaccg accatgtcc cgtccagcc aatg 34

<210> 33
<211> 25
<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 5
 <400> 33
 ttcggaccg tgtgcaaac tatgc 25
 <210> 34
 10 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Construcción sintética
 <400> 34
 ttcggtccg aactatacaa cctac 25
 20 <210> 35
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 35
 30 gacattggaa gatctgtgc aatctatg 29
 <210> 36
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Construcción sintética
 <400> 36
 40 ggagatctcg aactatacaa cctac 25
 <210> 37
 <211> 35
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 50 <400> 37
 gttattcagg ccgatgggtg tgaaggcaa gatcg 35
 <210> 38
 <211> 35
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Construcción sintética
 60 <400> 38
 cgatcttgcc ttccacacc atcggcctga ataac 35
 <210> 39
 65 <211> 212

ES 2 525 707 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Construcción sintética

<400> 39

```
gcatgcaact atacaaccta ctacctcacc cctatcacga ttagcattaa actacctgca 60
ctgtaagcac ttgactcac cgacagcggt gaatgttaca cagtcgaagg tctcaggac 120
ttcagttatc acagtactgt aggcattcac cgcgtgcctt agagctacag tgcttcattc 180
cacagctggt tgaaggggac caaagttaa ac 212
```

10

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico colaborador que comprende:
 - 5 (a) una secuencia de reconocimiento de la replicación en 5' de un alfavirus;
 - (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína estructural de un alfavirus;
 - (c) una secuencia de reconocimiento de la replicación en 3' de un alfavirus; y
 - (d) al menos una secuencia de microARN objetivo de un microARN endógeno celular.
- 10 2. El ácido nucleico colaborador de la reivindicación 1, en el que la secuencia de microARN objetivo tiene una complementariedad de al menos el 70 % con el microARN endógeno celular, o en el que al menos una secuencia de microARN objetivo está ubicado en una UTR en 3' o en una UTR en 5' de la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína estructural del alfavirus, o en el que al menos una secuencia de microARN objetivo está ubicado en una UTR en 3' de la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína estructural del alfavirus y al menos una secuencia objetivo de un microARN está ubicado en una UTR en 5' de la secuencia del ácido nucleico que codifica para la proteína estructural del alfavirus, o
 - 15 en el que al menos una secuencia de un microARN objetivo está ubicada en la región traducida de la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína estructural del alfavirus.
- 20 3. El ácido nucleico colaborador de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la proteína estructural del alfavirus es una proteína estructural del virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEE), o en el que la proteína estructural del alfavirus se elige de entre el grupo que consiste en una proteína estructural del Arbovirus surafricano N° 86, del virus de Sindbis, del virus del bosque de Semliki y del virus de Ross River.
- 25 4. El ácido nucleico colaborador de la reivindicación 1, el que la proteína estructural del alfavirus es una proteína de la cápside de un alfavirus, en el que el gen de la cápside ha eliminado la actividad de autoproteasa pero la función de empaquetamiento del ARN permanece inalterada, en el que opcionalmente la proteína de la cápside del alfavirus es una proteína de la cápside del VEE, que preferiblemente comprende una o más sustituciones de aminoácido en el residuo de aminoácido 152, 174 ó 226.
 - 30 5. El ácido nucleico colaborador de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el ácido nucleico colaborador comprende al menos dos secuencias de microARN objetivo.
 6. Una célula que comprende uno o más ácidos nucleicos colaboradores de cualquiera de las reivindicaciones 1-5,
 - 35 en la que la célula es una célula de empaquetamiento y se transforma de manera estable con al menos un ácido nucleico colaborador.
 7. Una célula o una composición que comprende
 - 40 (a) un primer ácido nucleico colaborador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y
 - (b) un replicón de un alfavirus.
 8. La célula o la composición de la reivindicación 7, en la que el primer ácido nucleico colaborador codifica para al menos una, pero no todas, las proteínas estructurales necesarias para crear una partícula de replicón semejante a
 - 45 virus, y que comprende adicionalmente un segundo ácido nucleico colaborador que comprende al menos una secuencia de un microARN objetivo de un microARN endógeno celular y una secuencia de un ácido nucleico que codifica para una proteína estructural del alfavirus, en la que el segundo ácido nucleico colaborador codifica para al menos una o más de las proteínas estructurales del alfavirus no codificadas por el primer ácido nucleico colaborador.
 - 50 9. La célula de cualquiera de las reivindicaciones 7-8, que comprende adicionalmente un inhibidor del al menos un microARN endógeno celular, en donde la célula comprende además opcionalmente un ácido nucleico que codifica para el inhibidor del microARN celular.
 - 55 10. Una población de partículas de replicón semejantes a alfavirus (ARPs) que comprende (i) un primer subconjunto de partículas que comprende un replicón y (ii) un segundo subconjunto de partículas que comprende el ácido nucleico colaborador de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o un fragmento de las mismas, en el que el fragmento comprende al menos una secuencia de un microARN objetivo de un microARN endógeno celular, y un replicón.
 - 60 11. Un método para la elaboración *in vitro* de partículas de replicón semejantes a alfavirus (ARPs) que comprende:
 - (a) transfectar una célula con (i) un replicón, y (ii) uno o más ácidos nucleicos colaboradores de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que las proteínas estructurales del alfavirus necesarias para la elaboración de las ARPs están codificadas por uno o más de la célula, el replicón o el uno o más ácidos
 - 65 nucleicos colaboradores; y

- (b) cultivar la célula en unas condiciones que permitan la producción de las ARPs ensambladas que comprenden el replicón; y
- (c) aislar las ARPs.

- 5 12. El método de la reivindicación 11, en el que la célula se transfecta con un primer ácido nucleico colaborador y con un segundo ácido nucleico colaborador, en el que el primer y el segundo ácido nucleico colaborador codifican para las proteínas estructurales del alfavirus necesarias para la elaboración de las ARPs, y en el que el segundo ácido nucleico colaborador codifica para al menos una o más proteínas estructurales del alfavirus no codificadas por el primer ácido nucleico colaborador; y en el que la célula de empaquetamiento opcionalmente no contiene el
- 10 microARN celular que reconoce la secuencia de un microARN objetivo presente en el ácido nucleico colaborador.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11-12, en el que la célula se cultiva en presencia de un inhibidor de al menos un microARN endógeno celular.
- 15 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 11-12 o la población de la reivindicación 10, en el que las ARPs son ARPs del virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEE), o en el que la ARP se elige de entre el grupo que consiste en ARPs del Arbovirus surafricano N° 86, del virus de Sindbis, del virus del bosque de Semliki y del virus Ross River.
- 20 15. La población de partículas de replicón semejantes a alfavirus de cualquiera de las reivindicaciones 10 ó 14, o elaboradas mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, para su uso en la inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto.

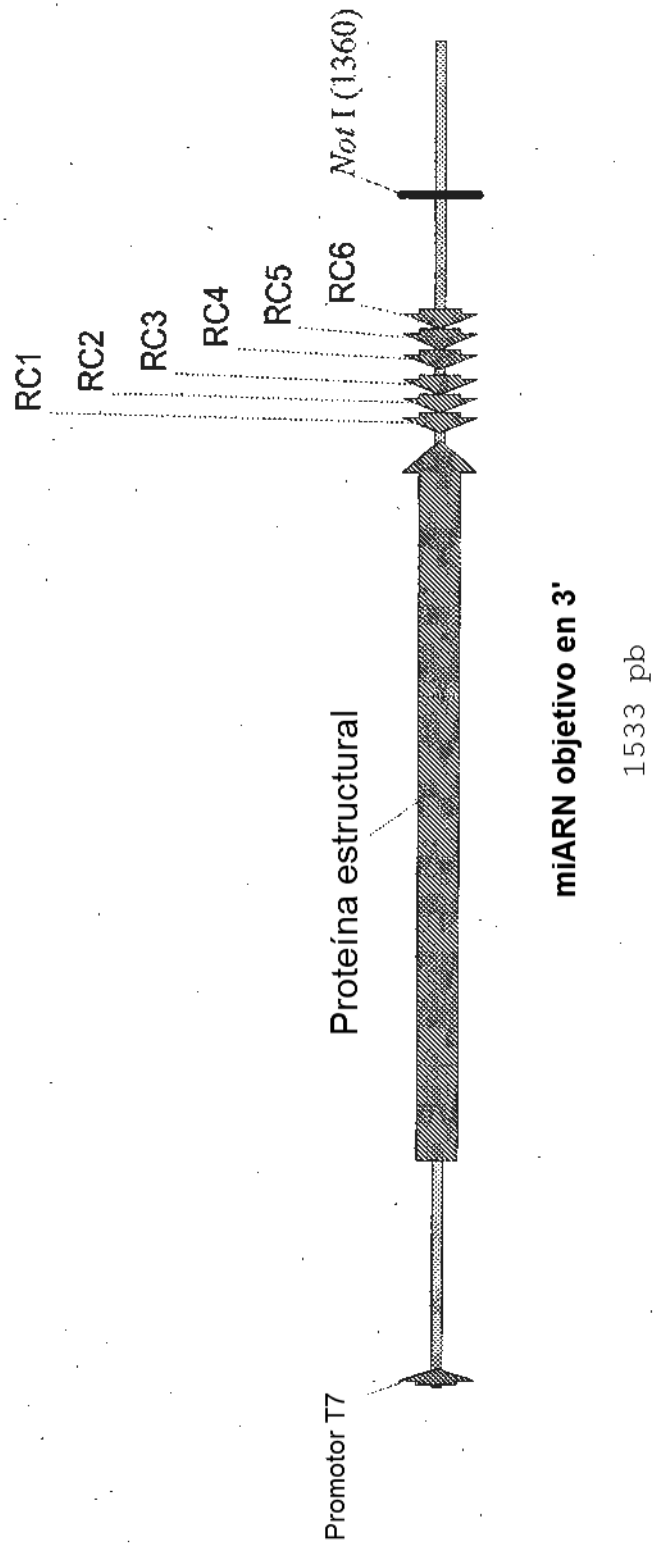


Figura 1

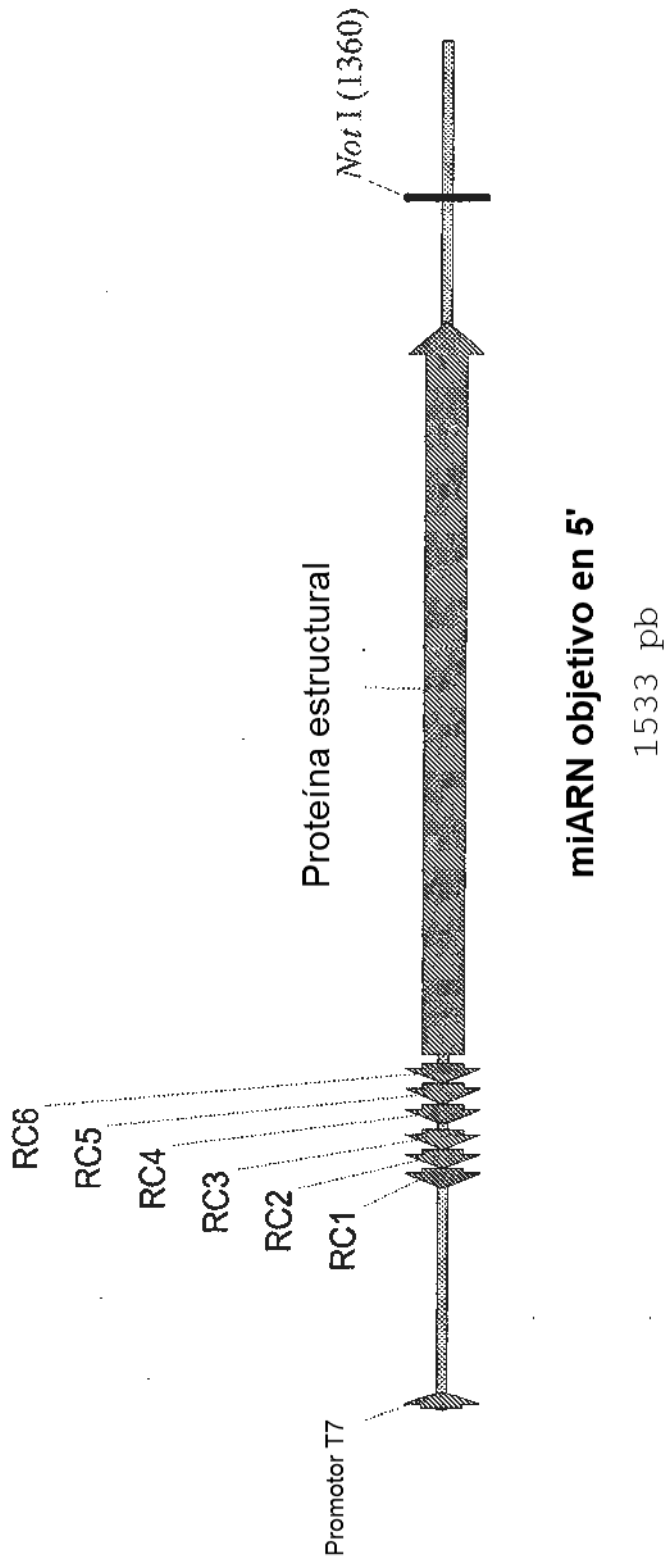


Figura 2

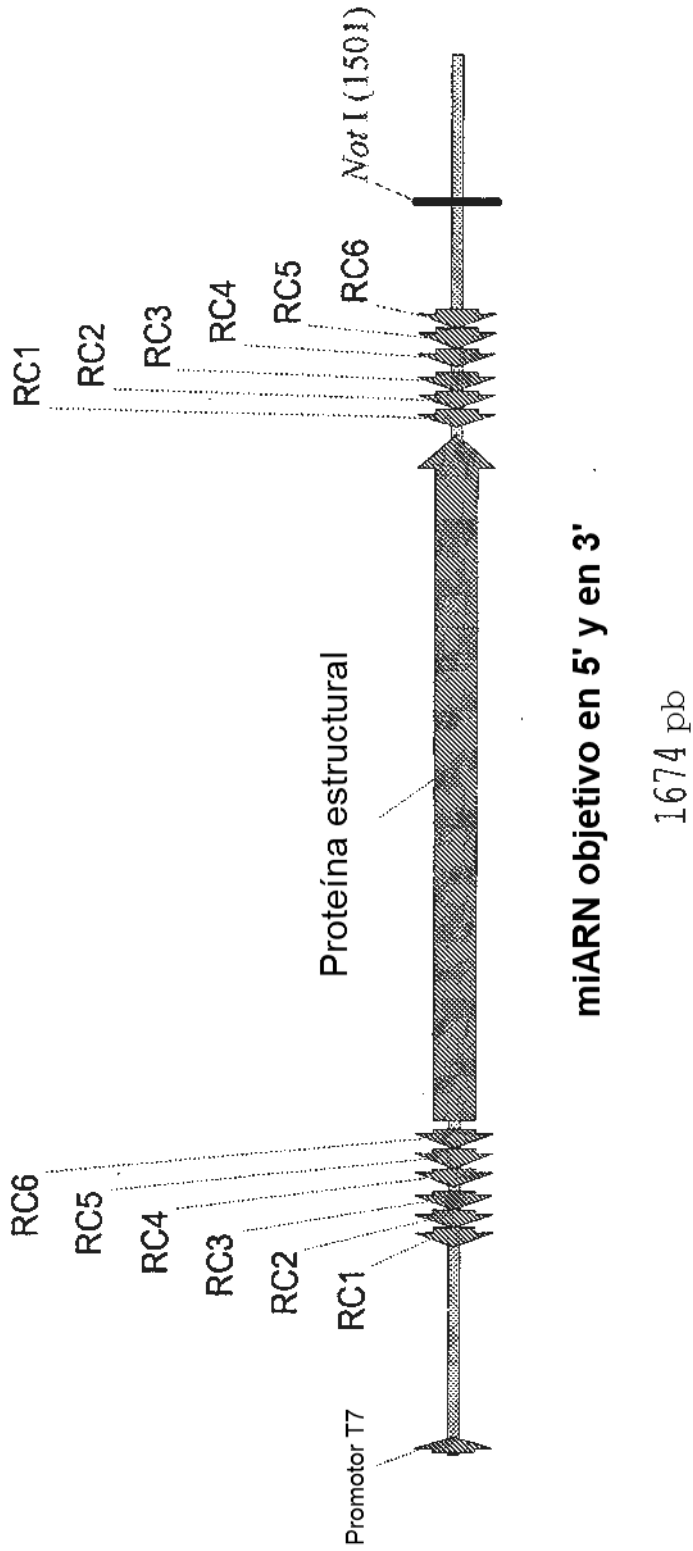


Figura 3

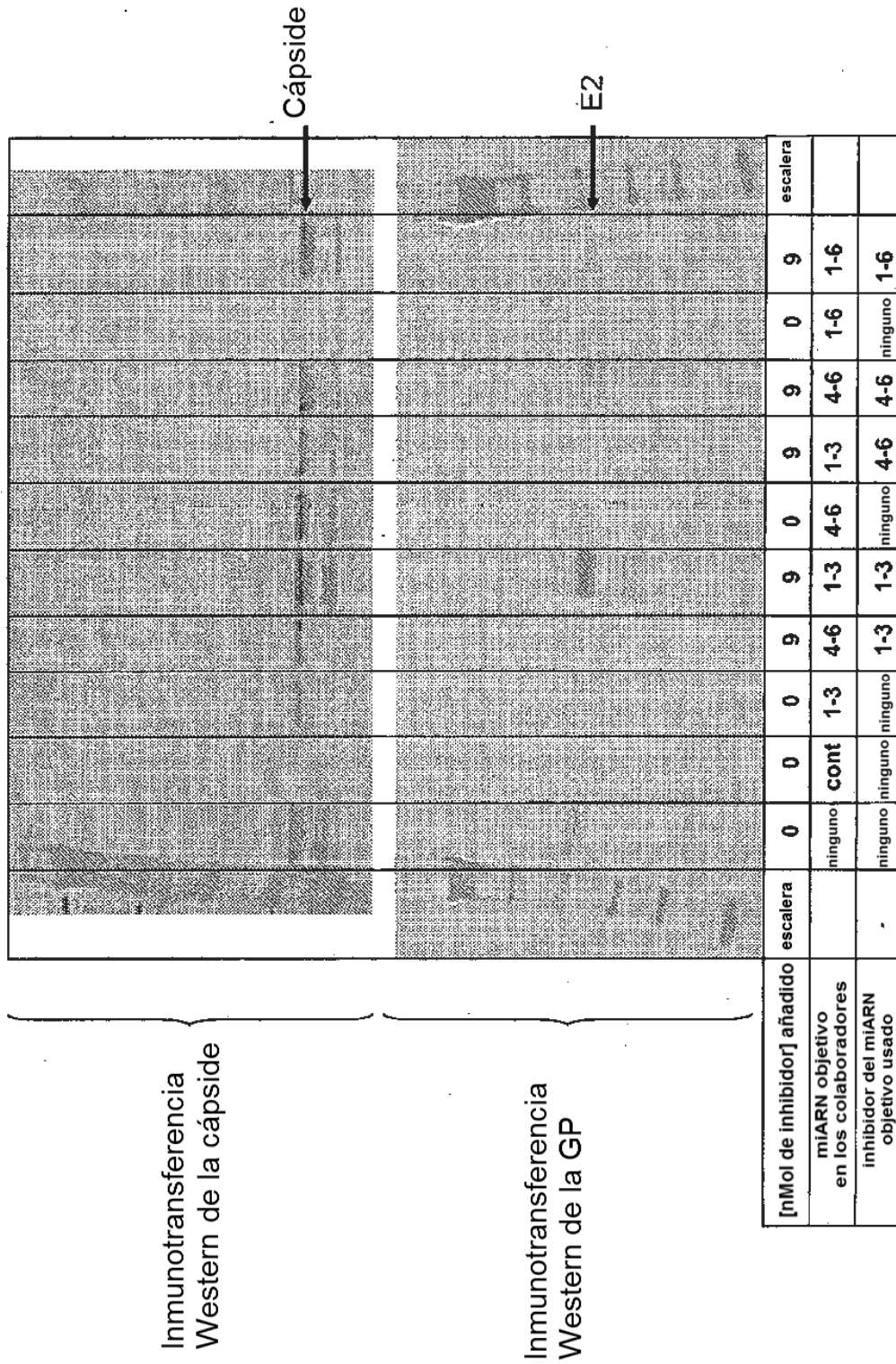


Figura 4

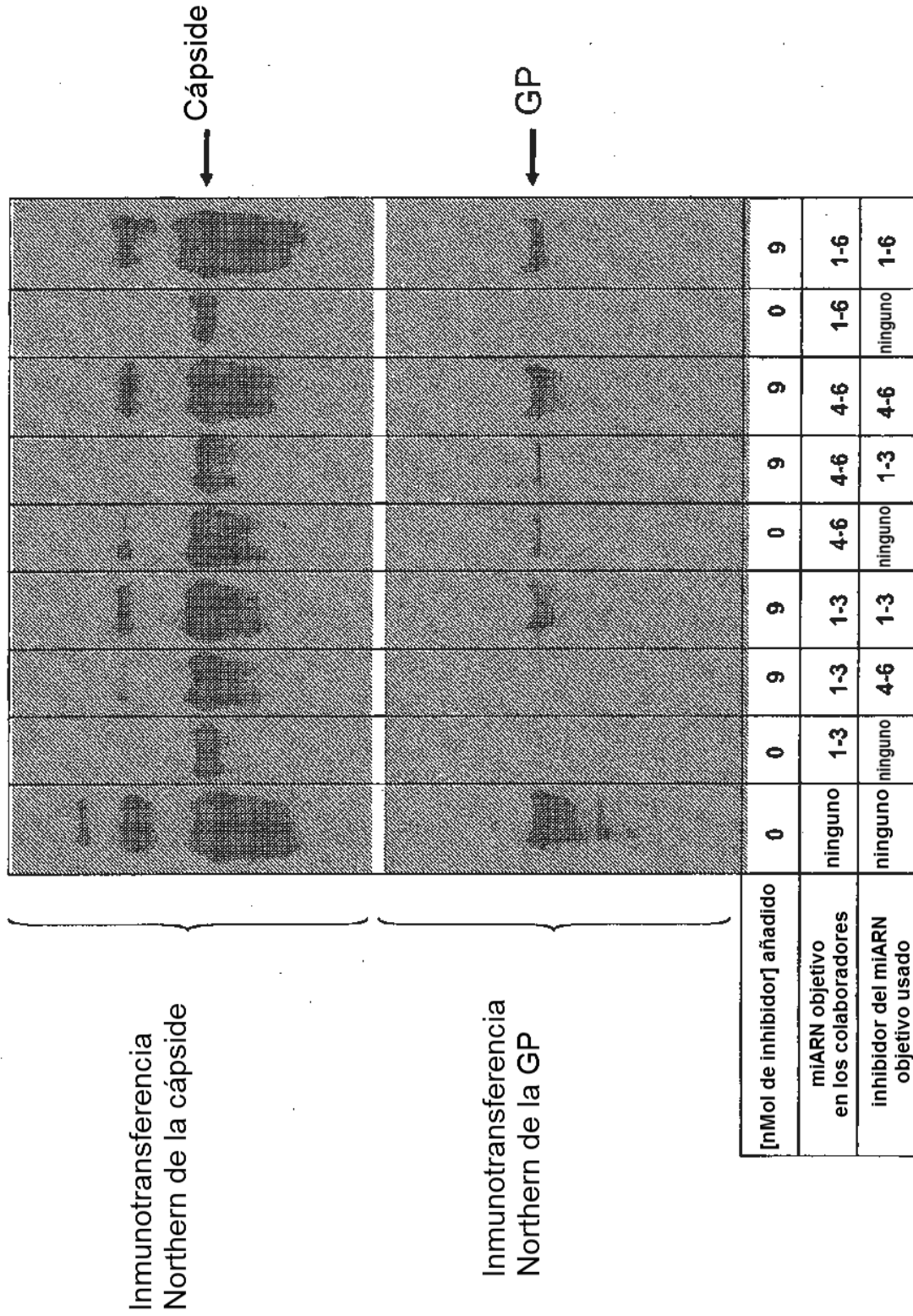


Figura 5

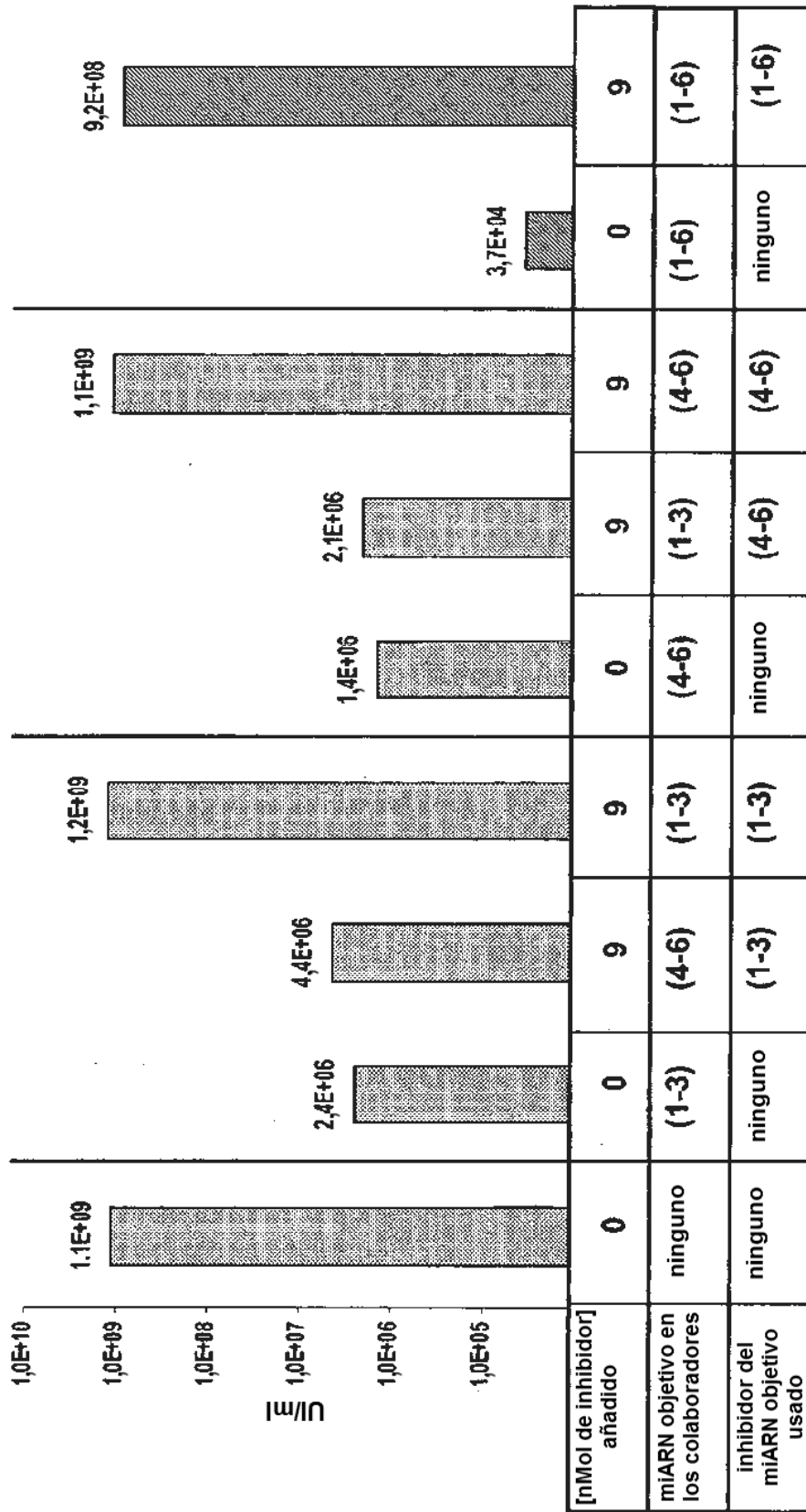


Figura 6

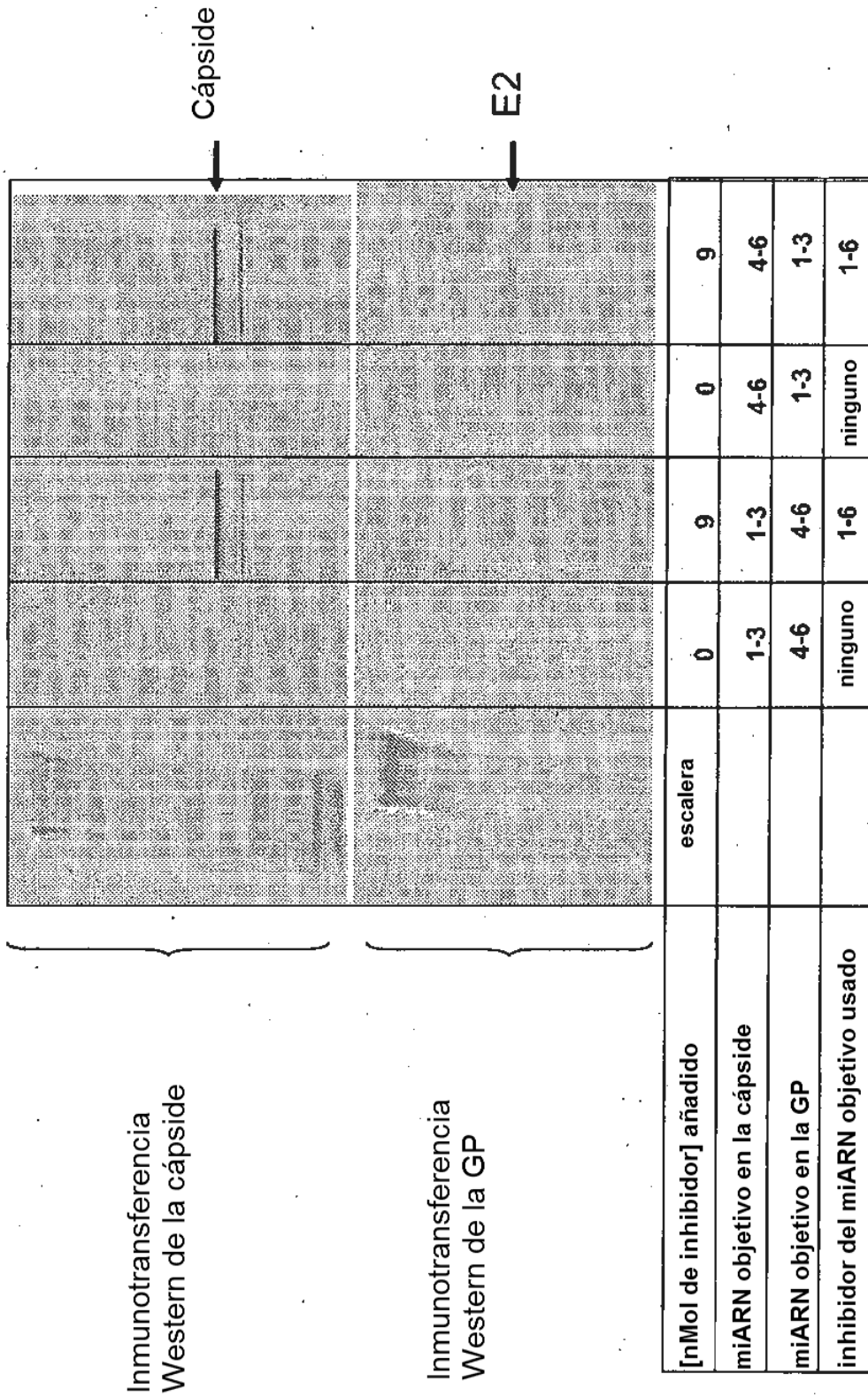


Figura 7

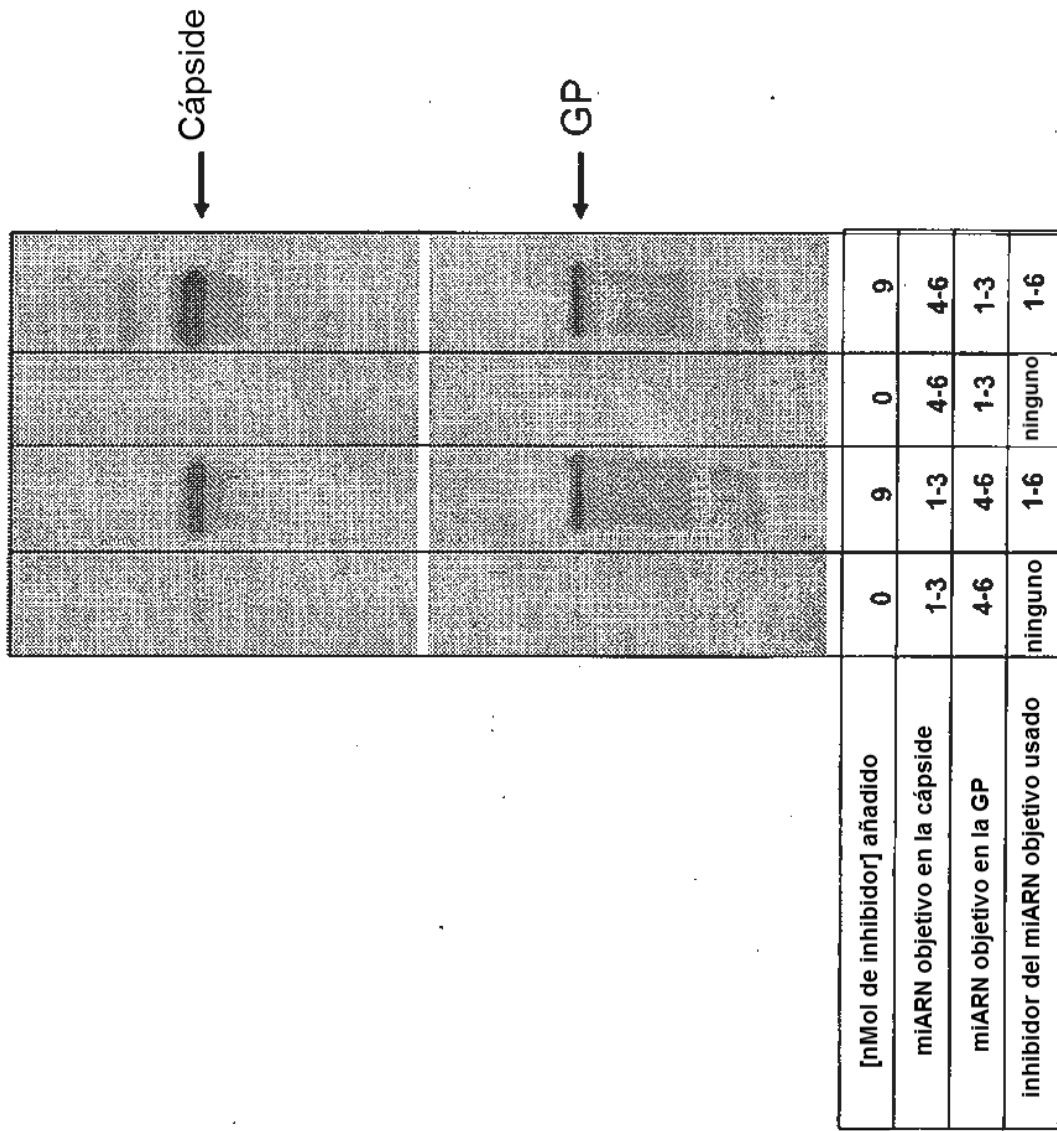


Figura 8

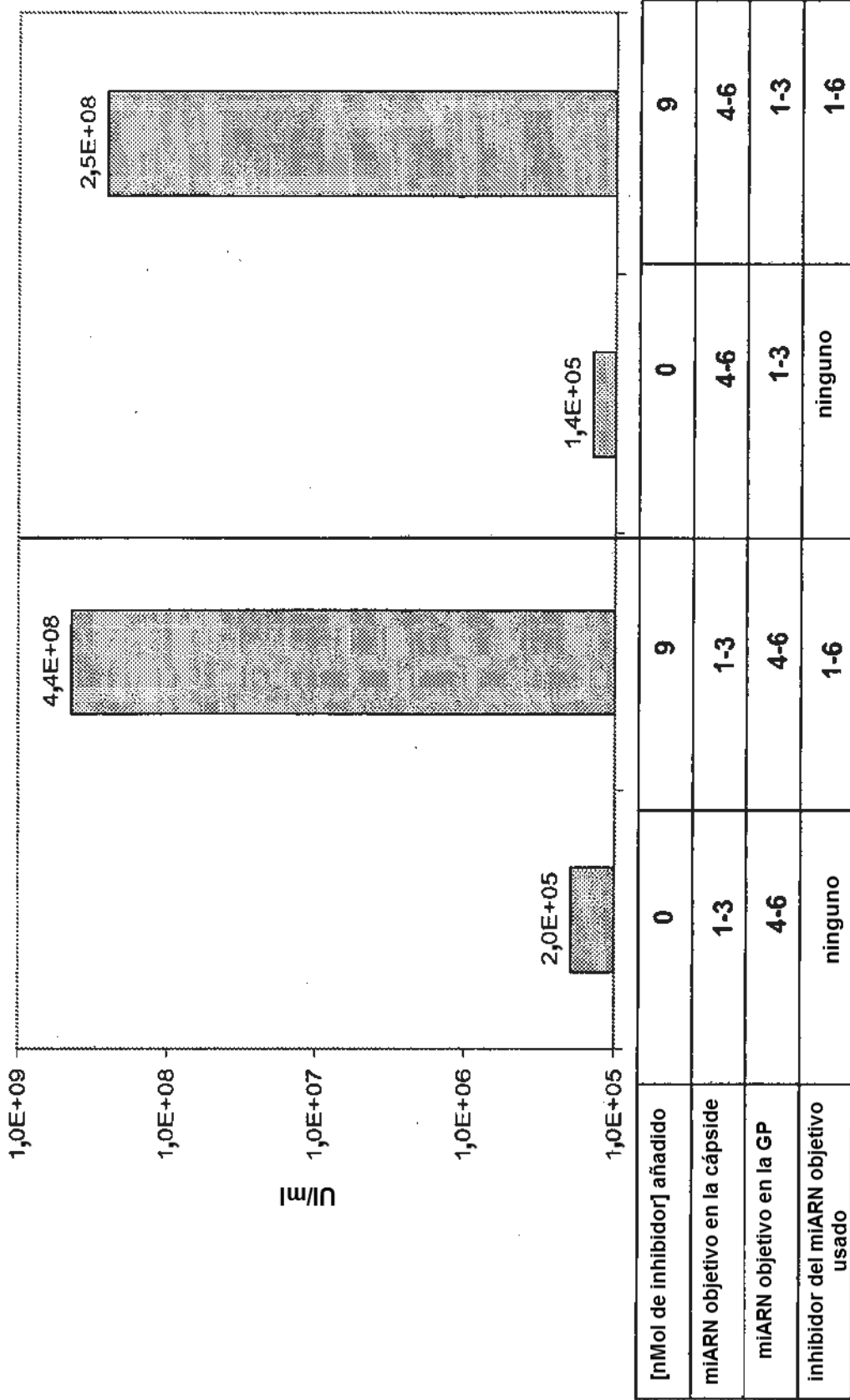


Figura 9

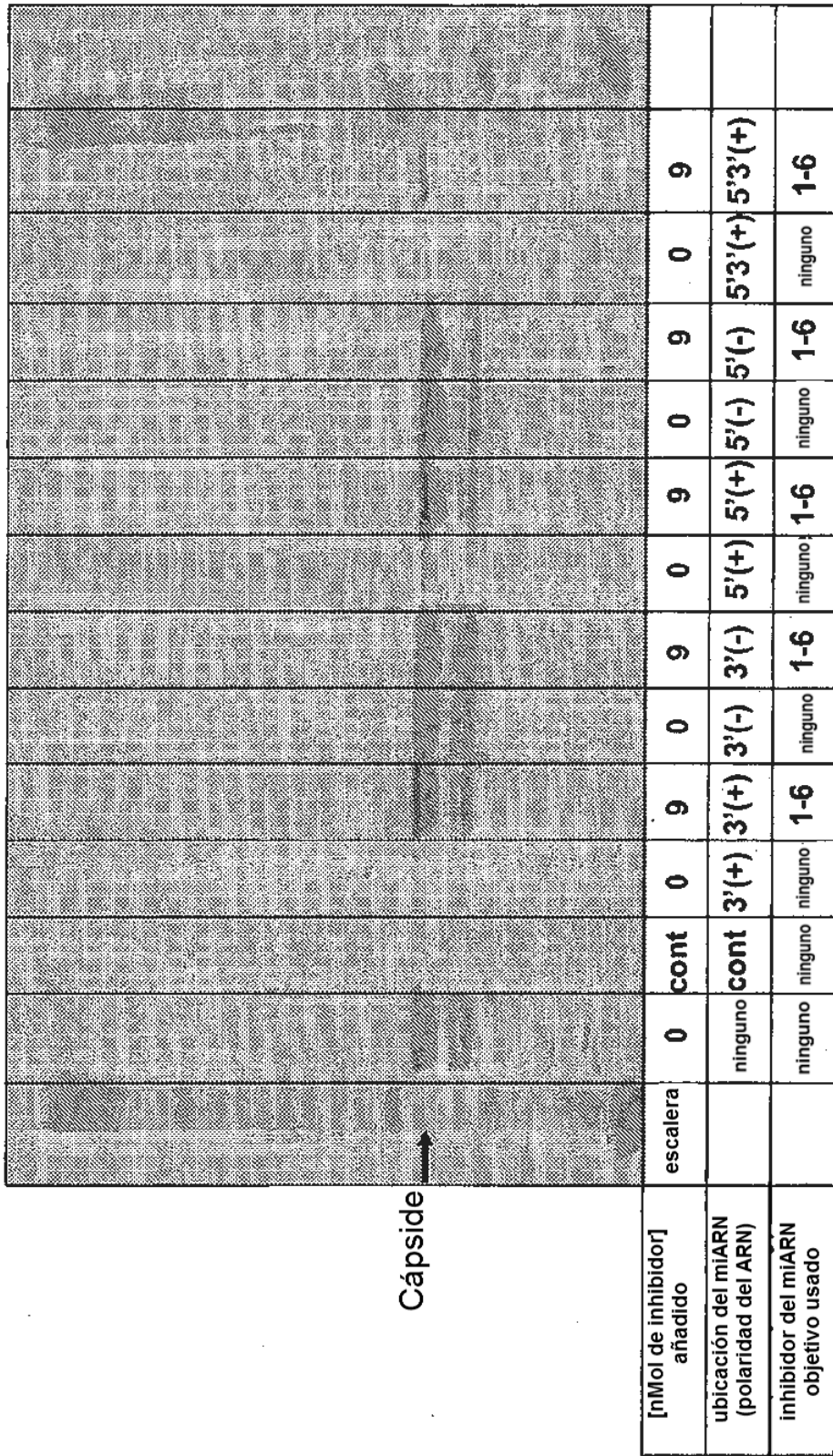


Figura 10

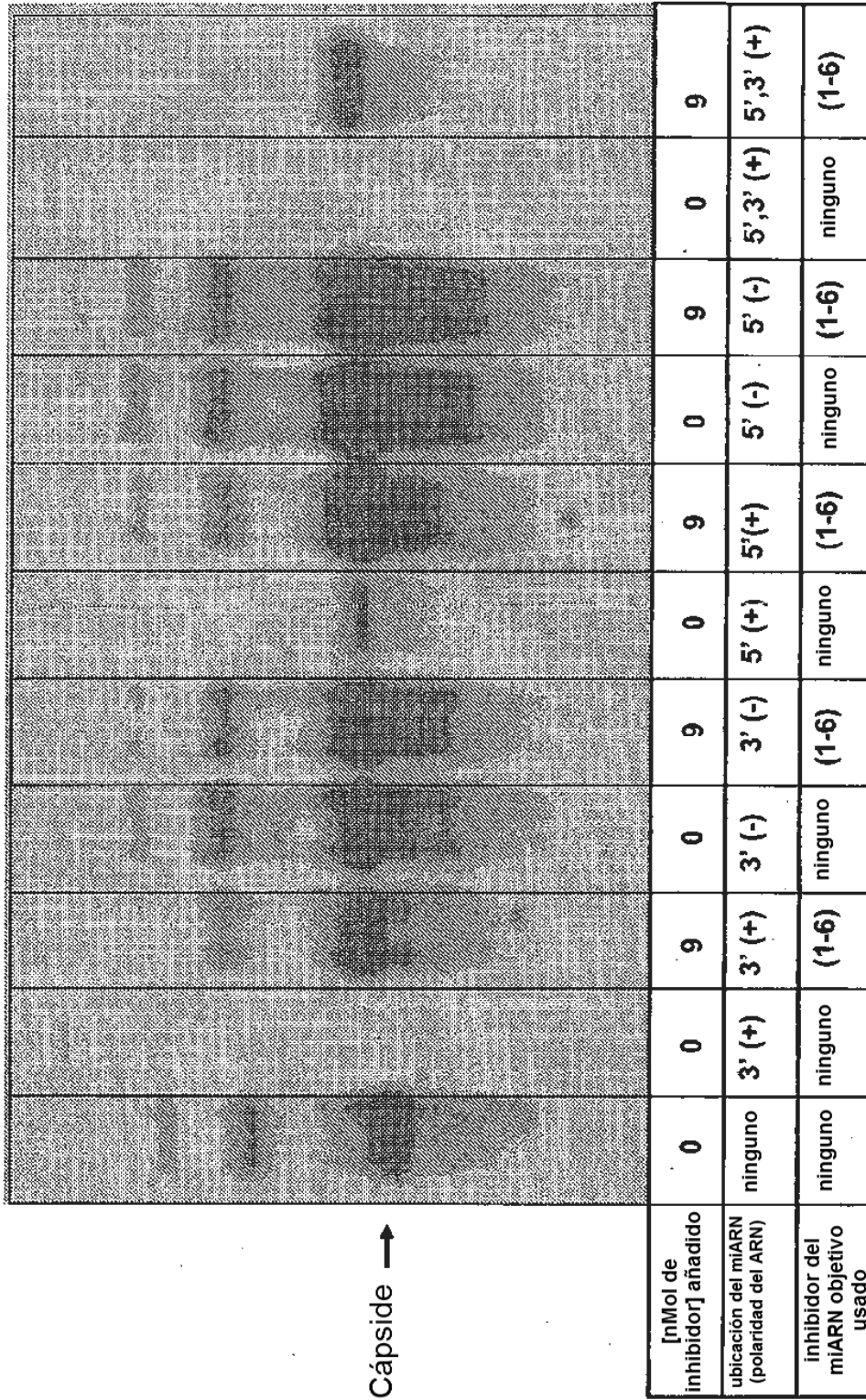


Figura 11

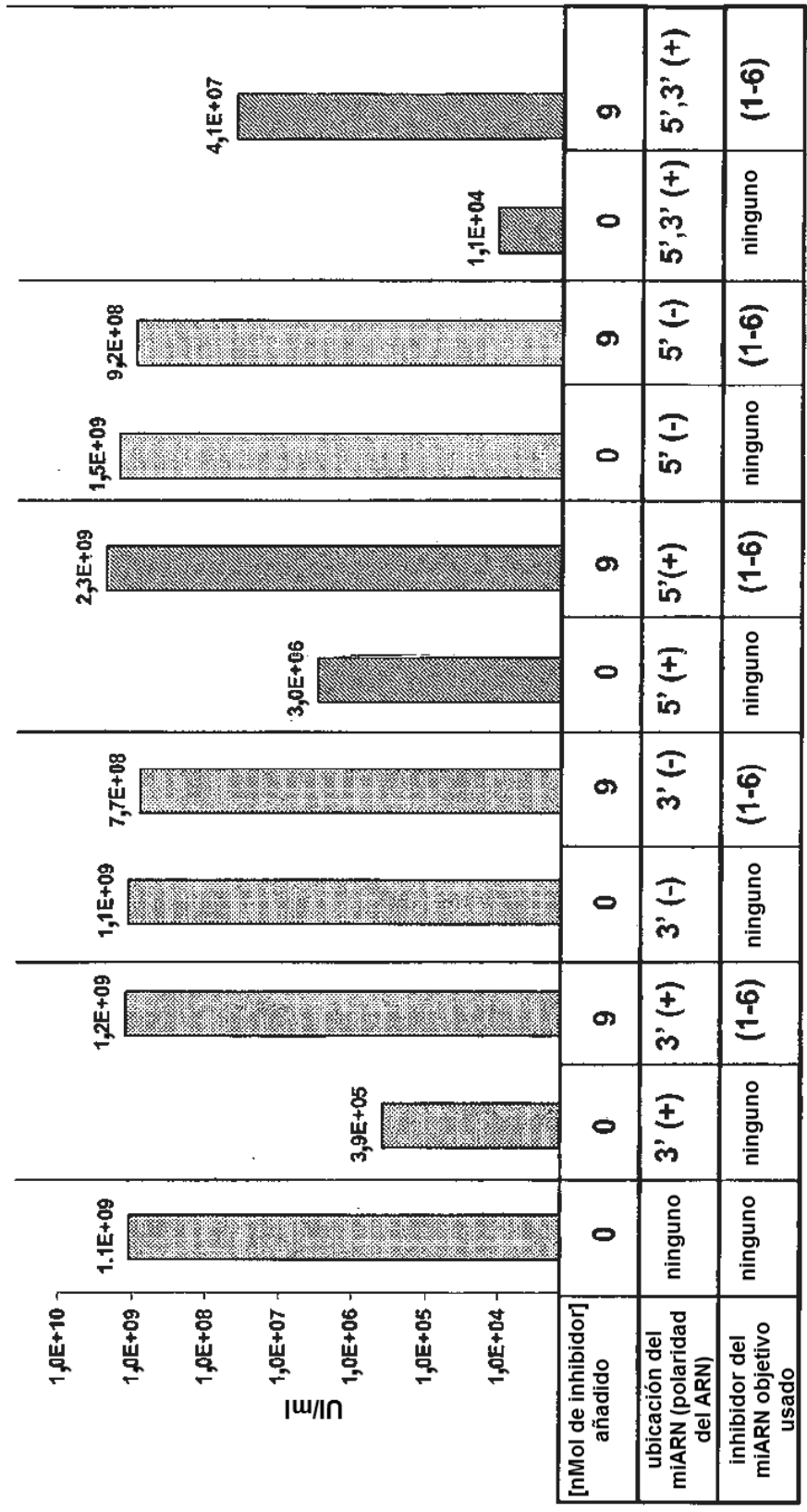


Figura 12

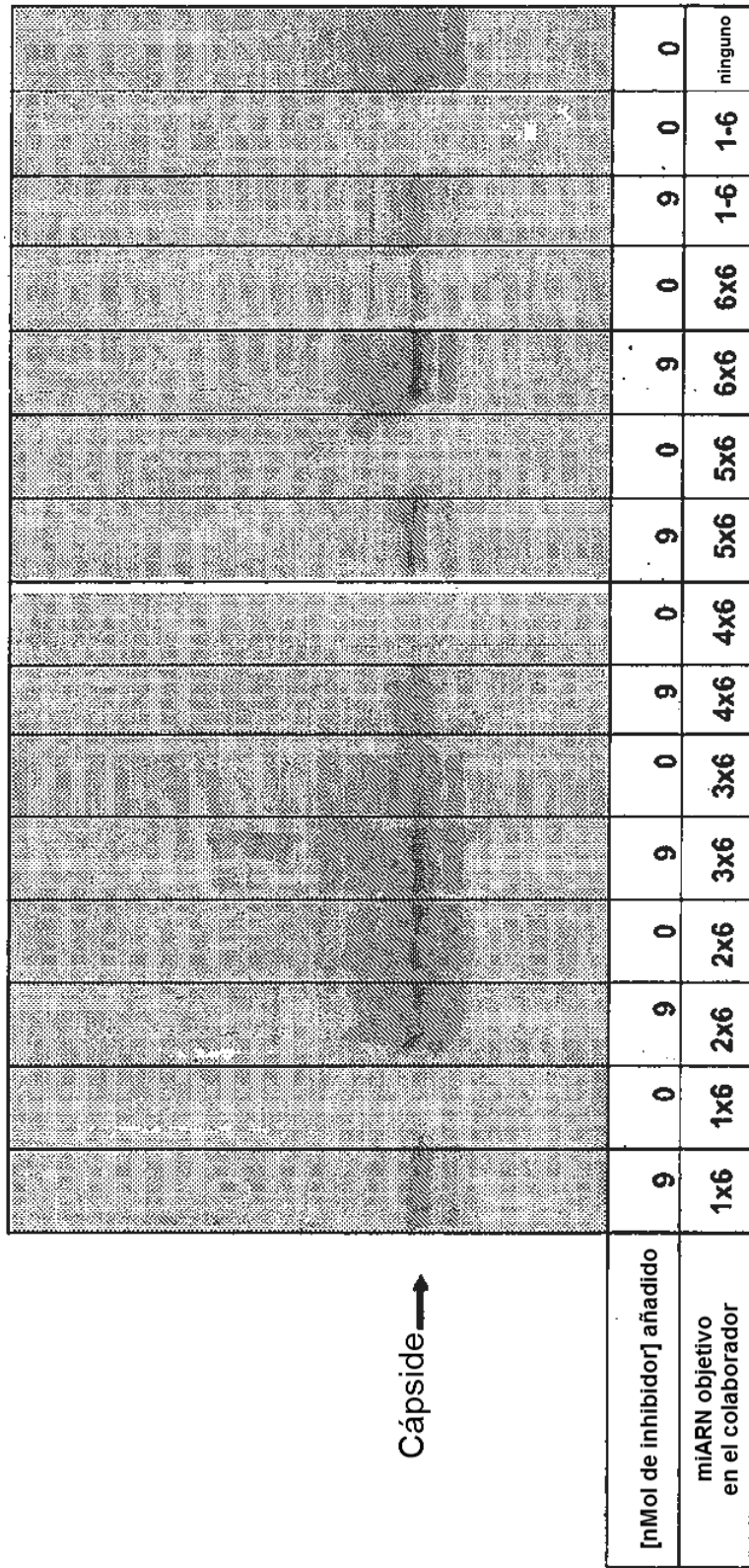


Figura 13

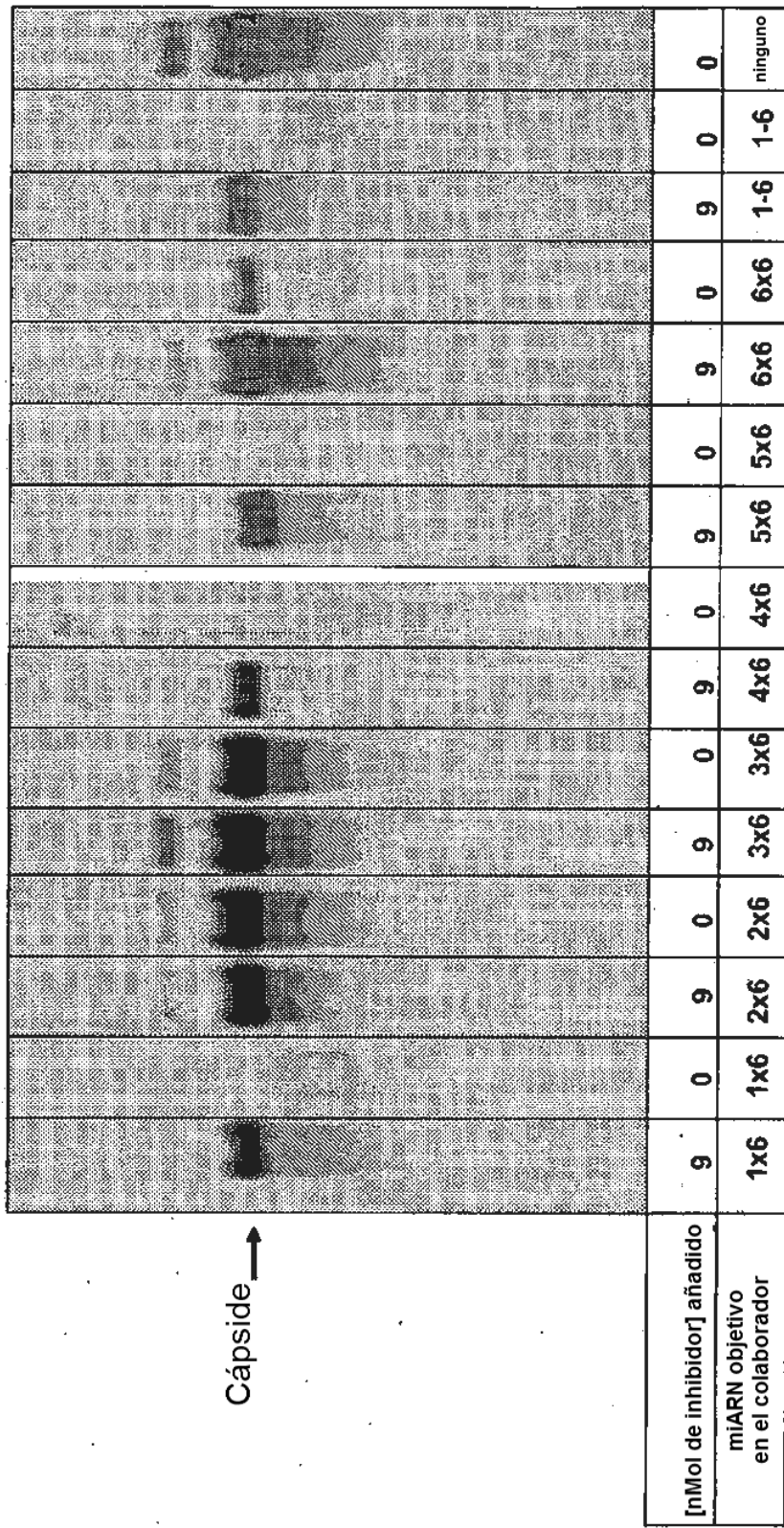


Figura 14

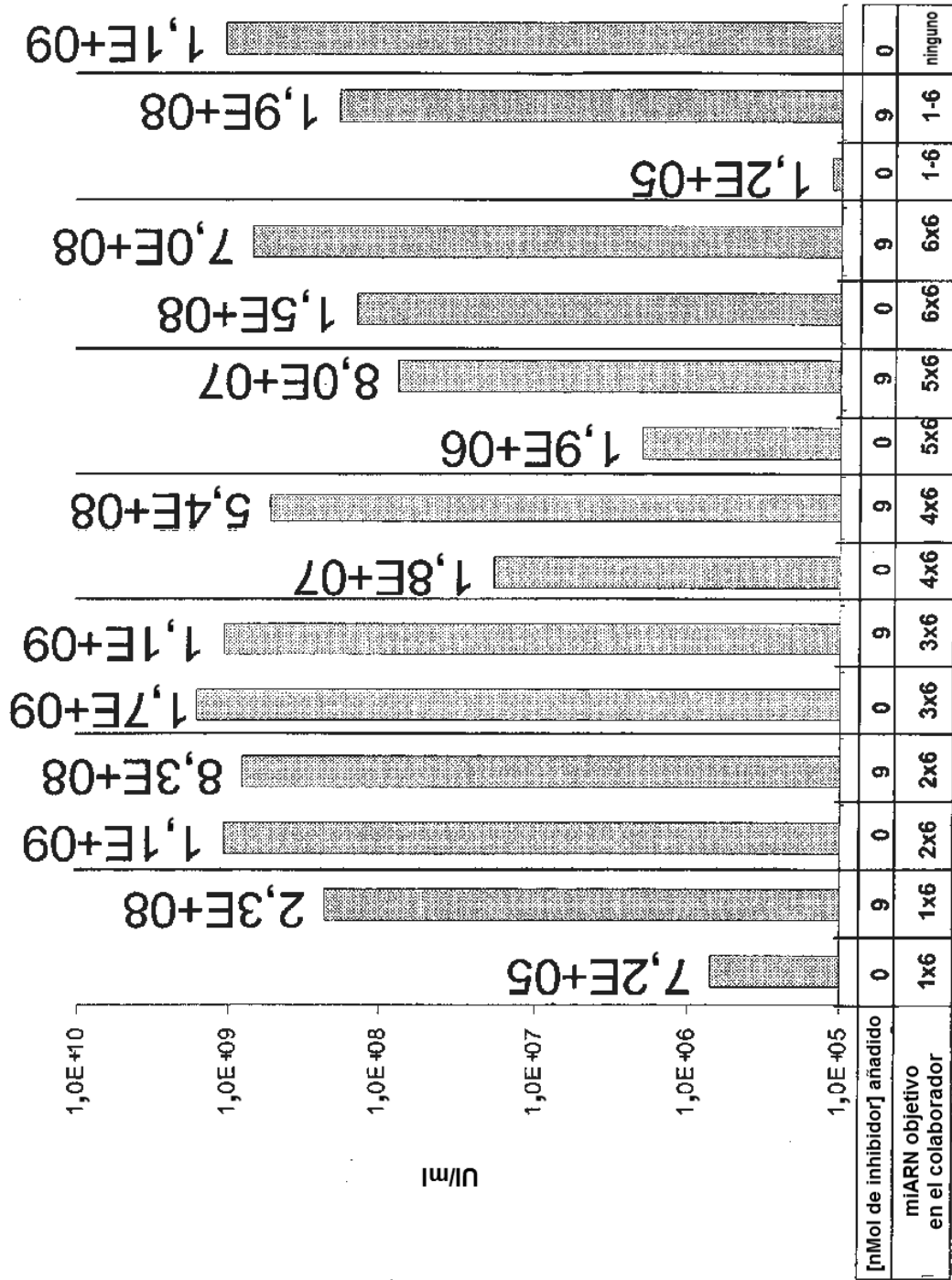


Figura 15

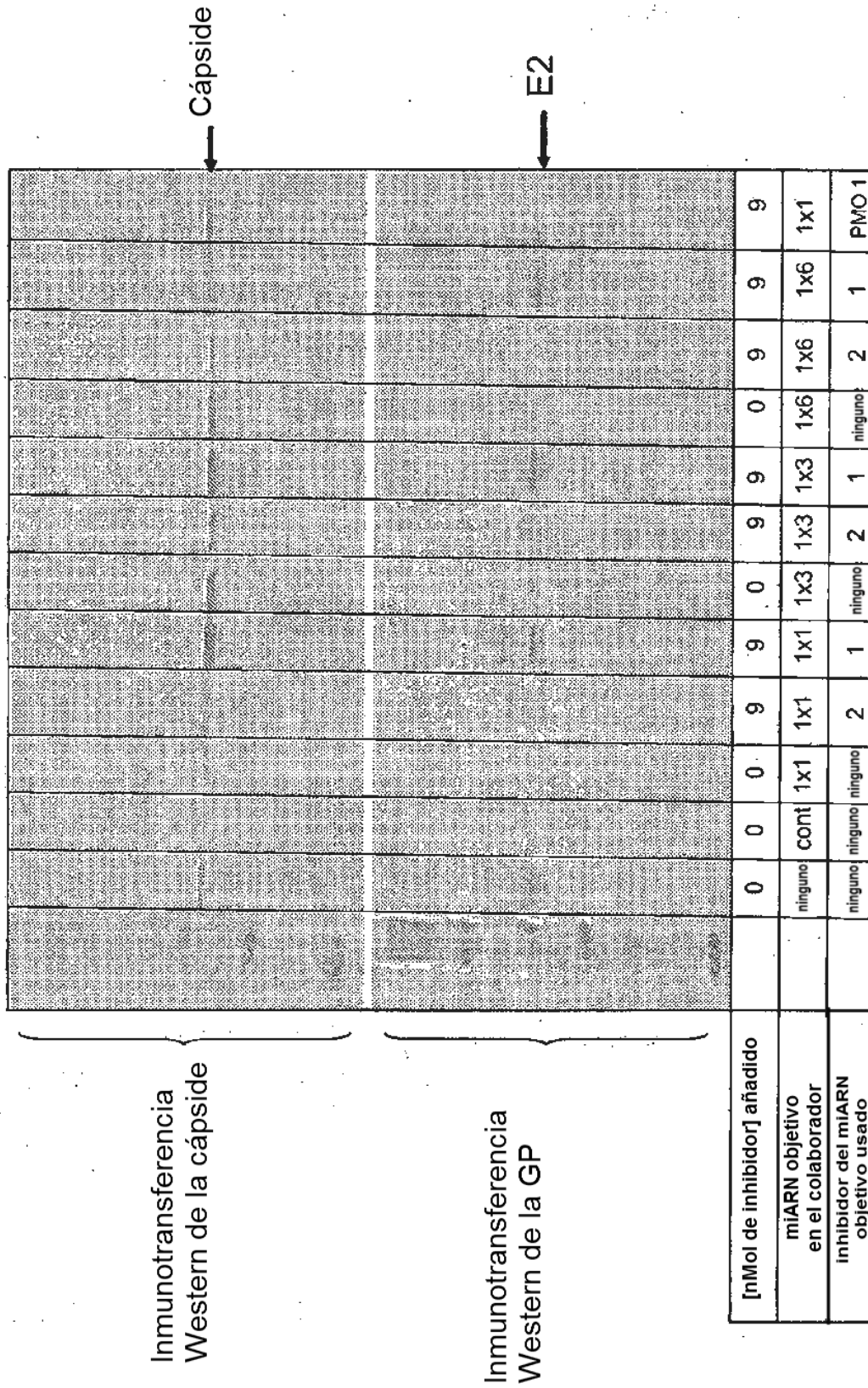


Figura 16

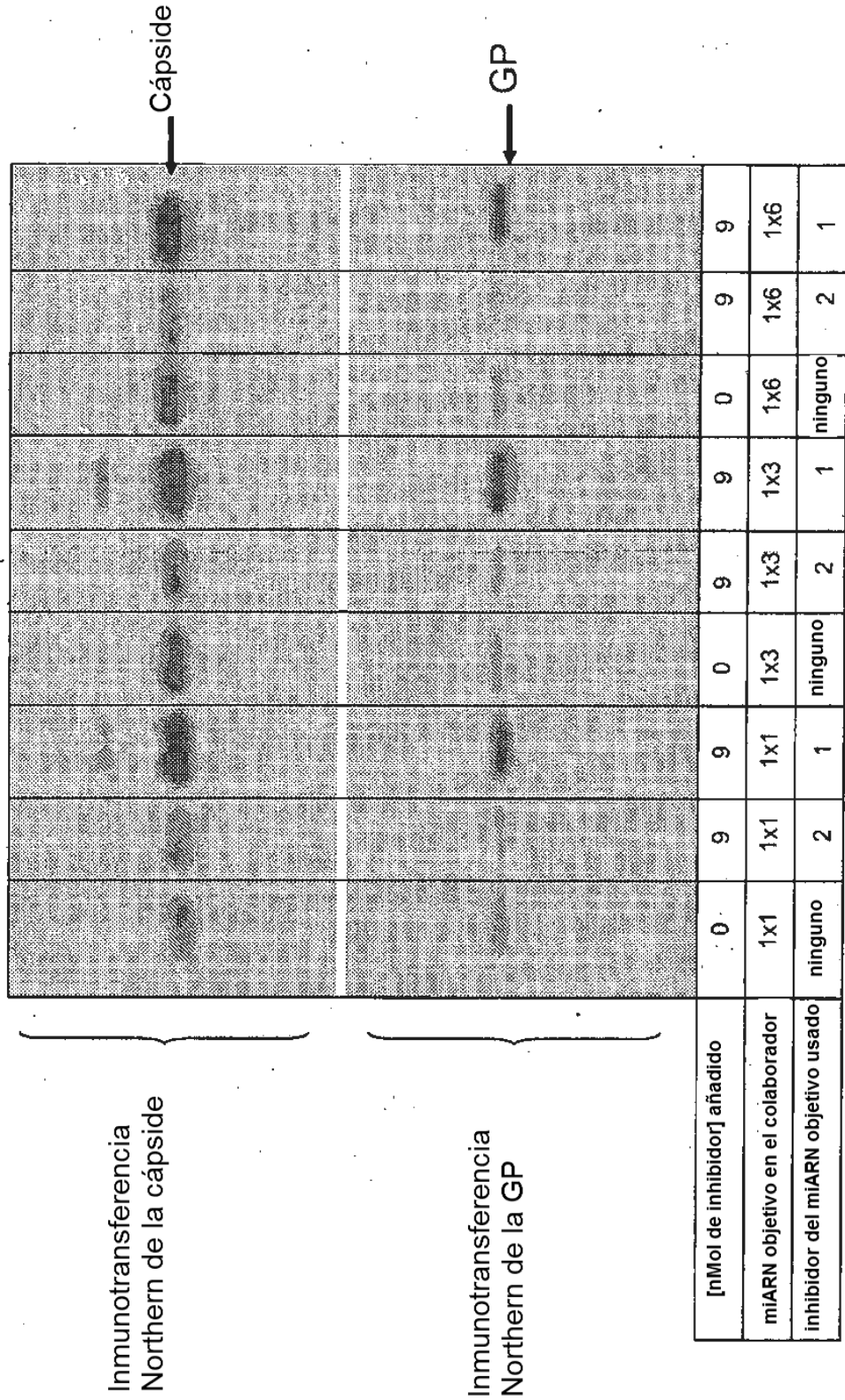


Figura 17

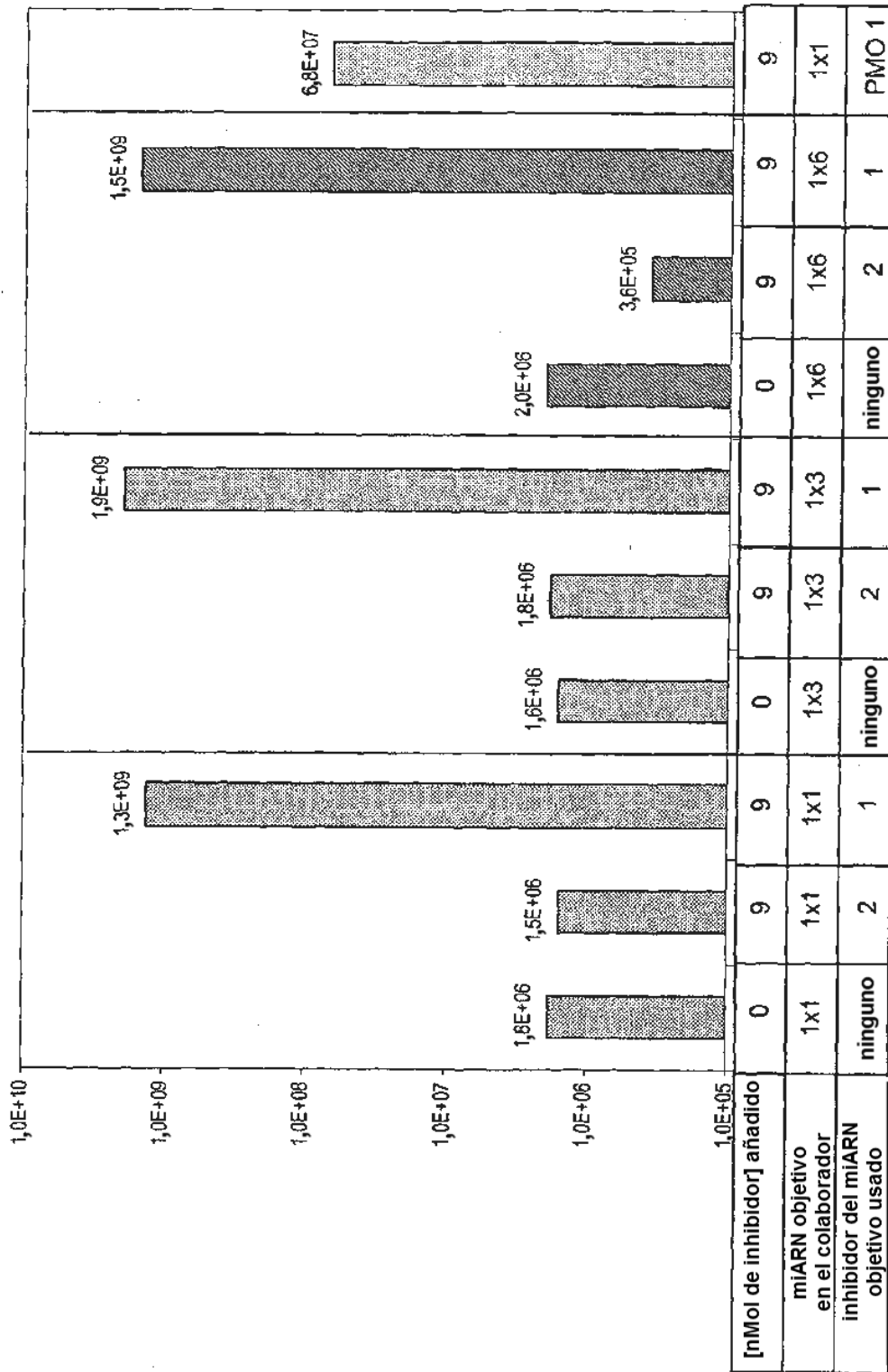


Figura 18

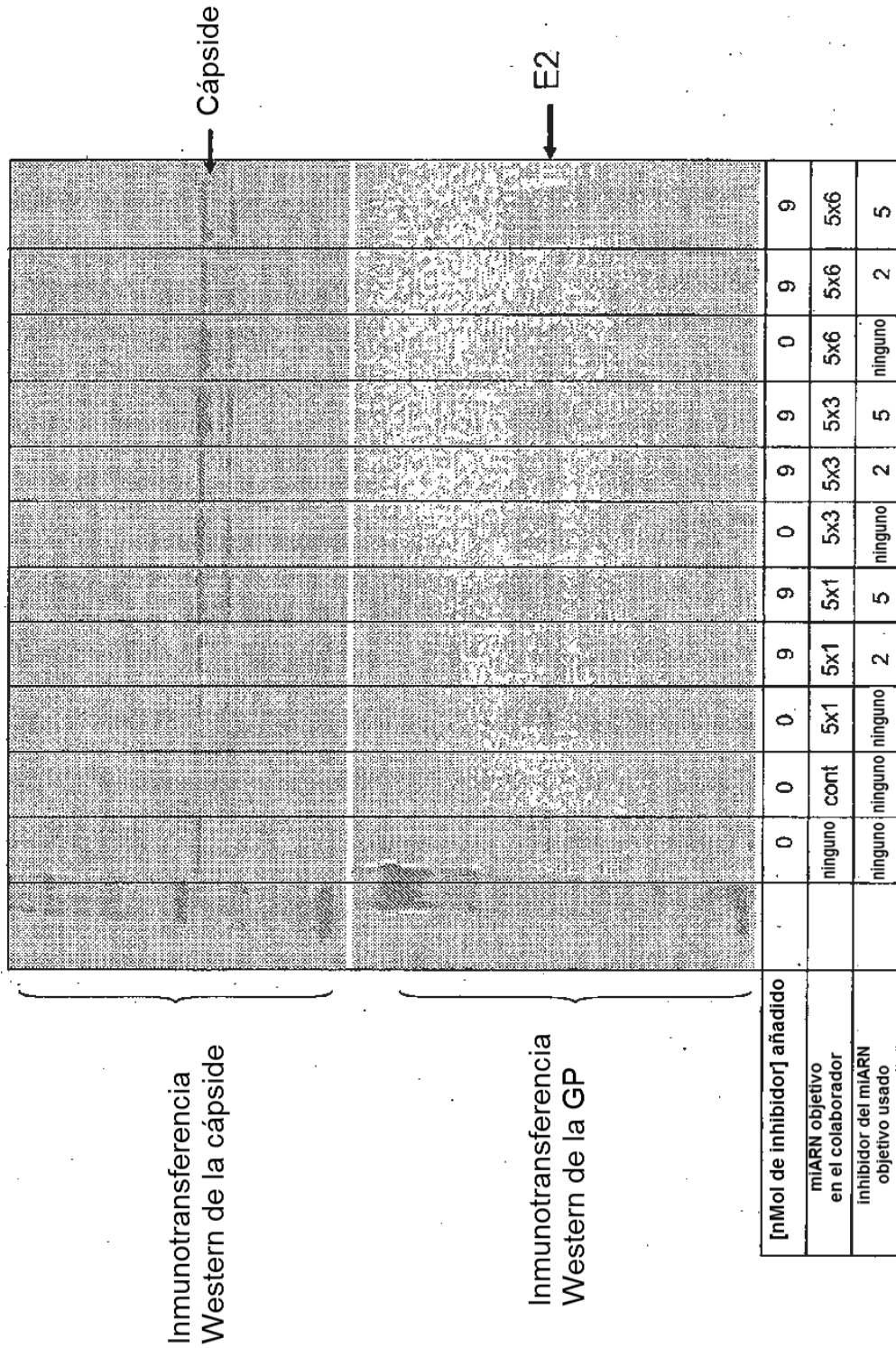


Figura 19

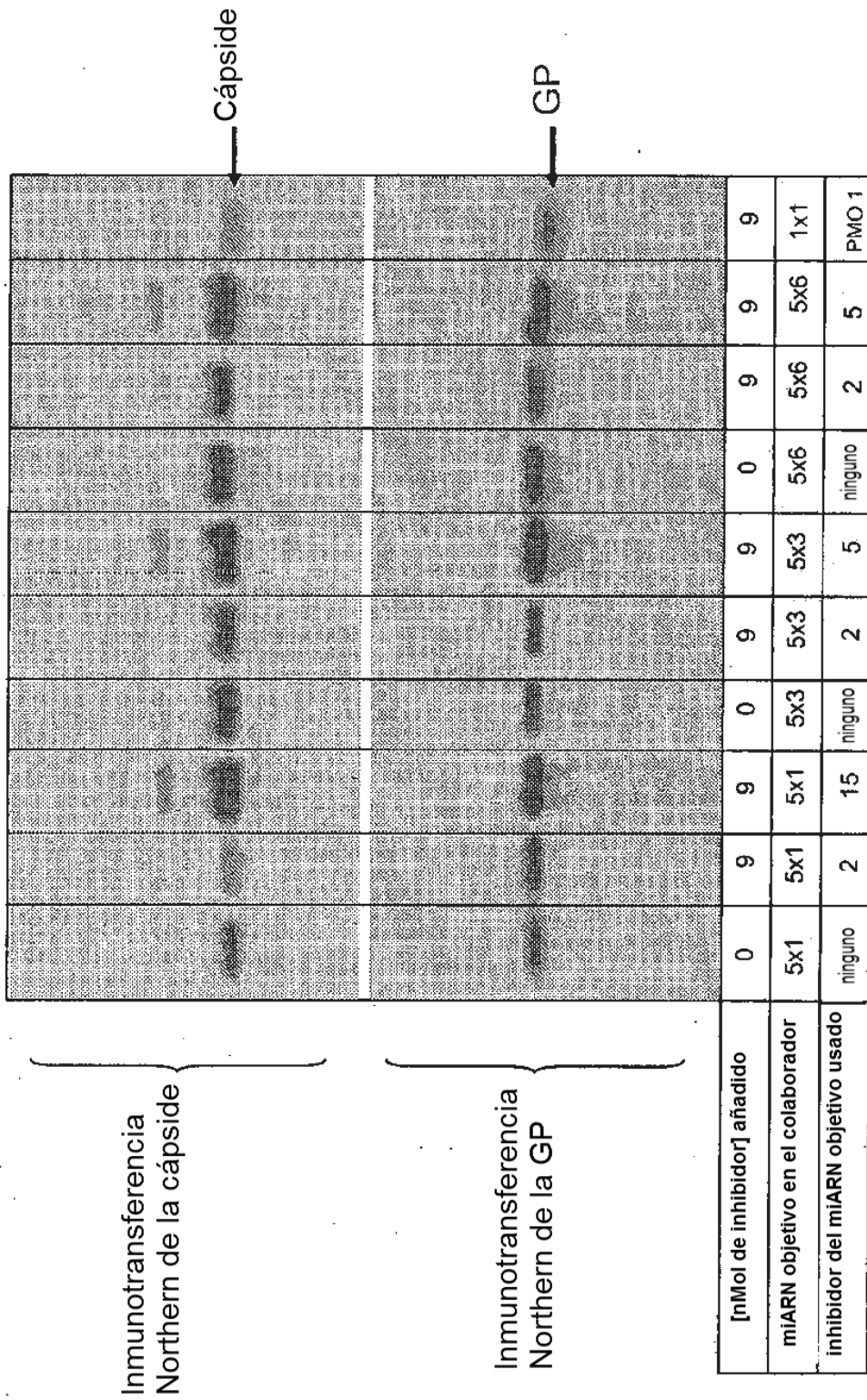


Figura 20

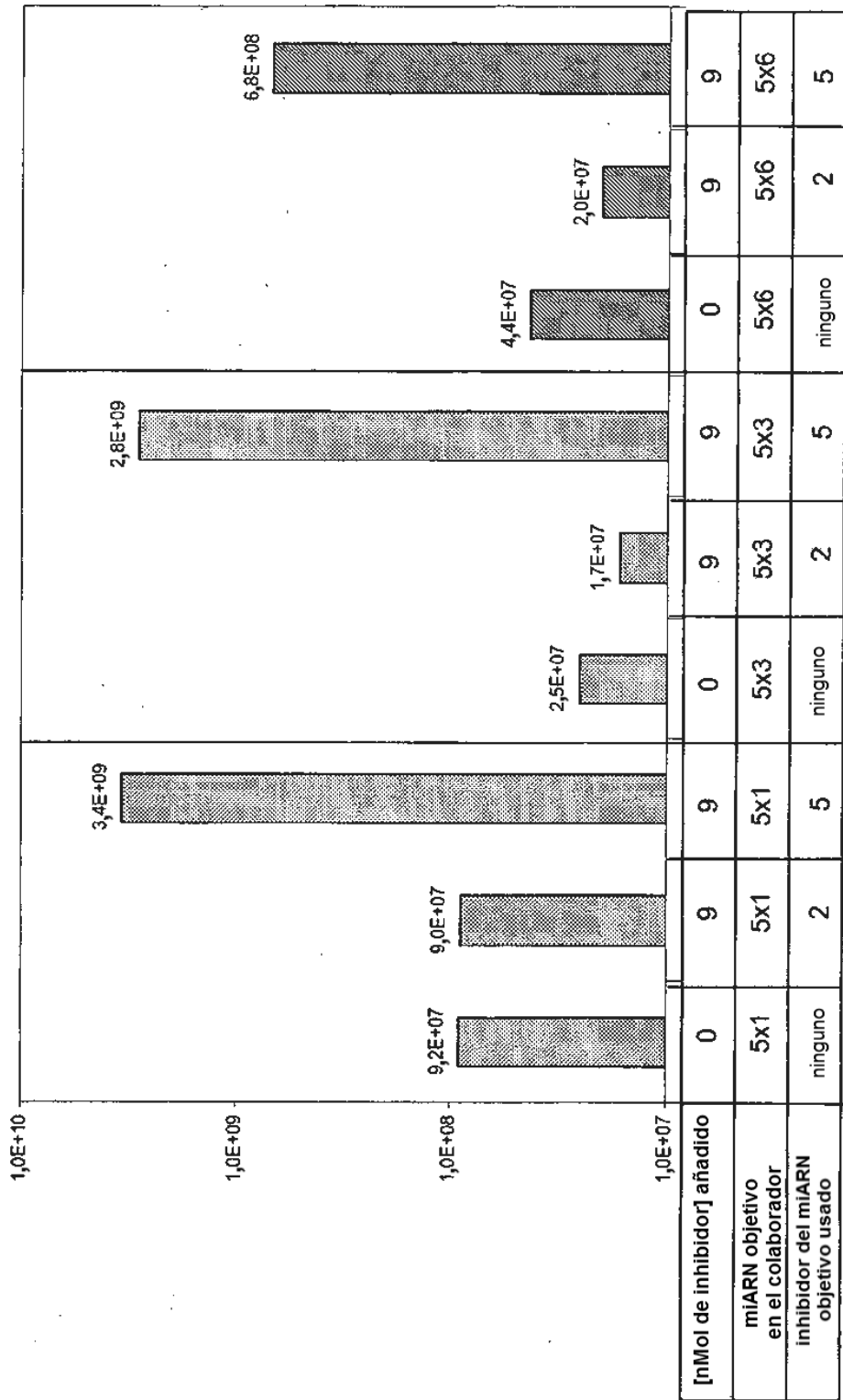


Figura 21

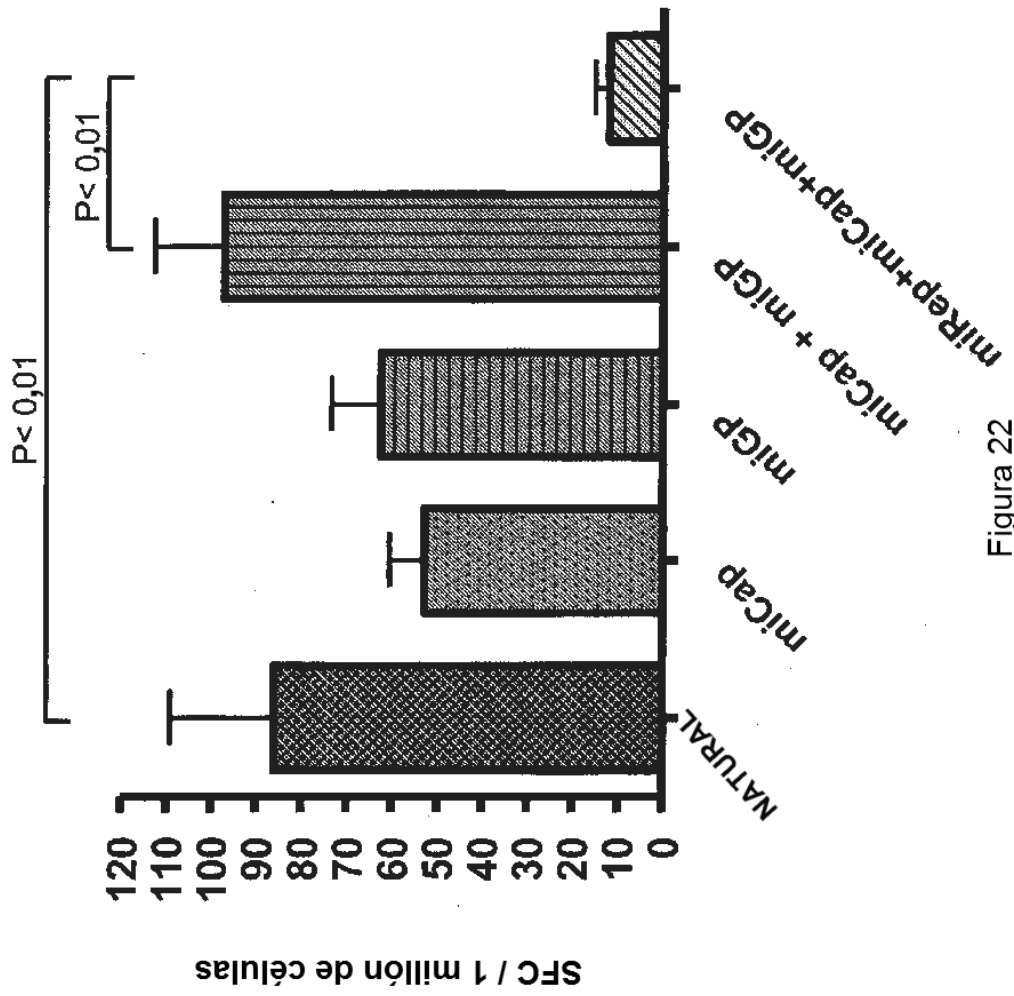


Figura 22

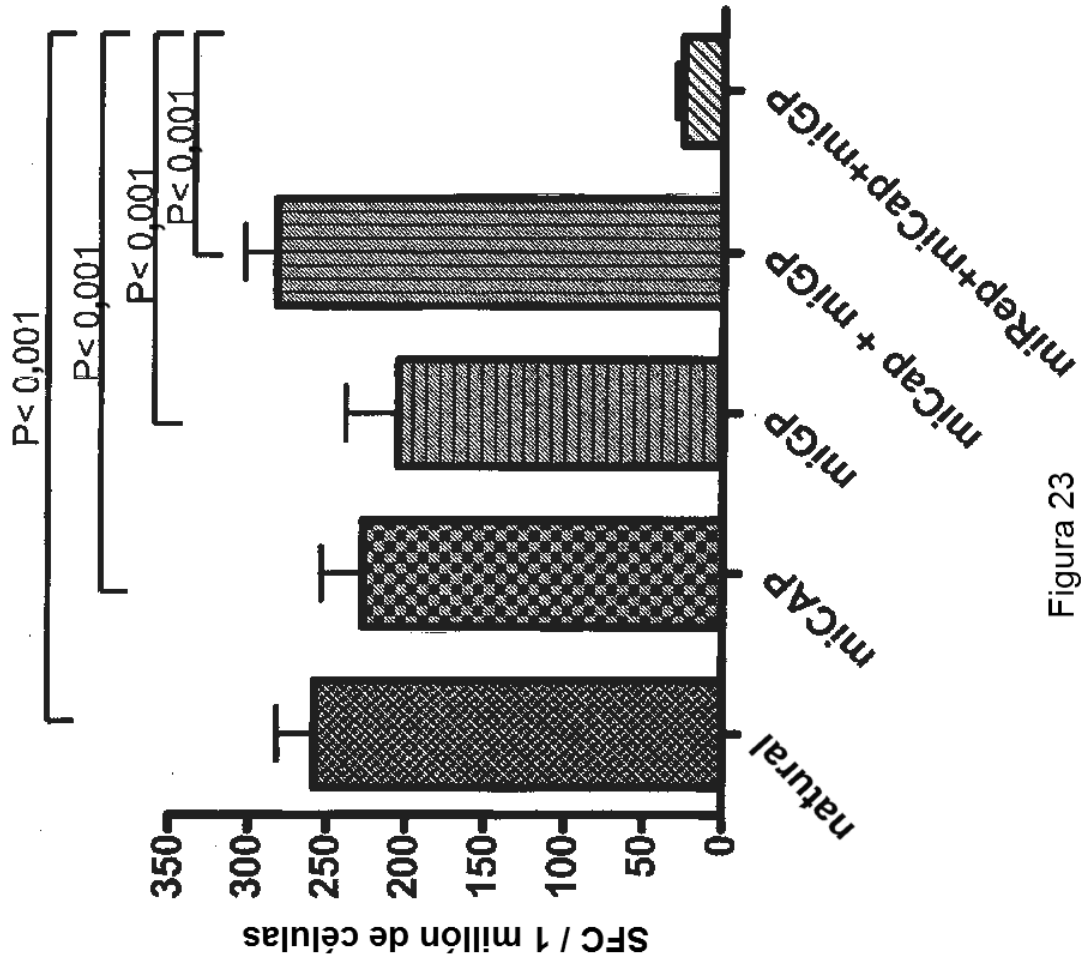


Figura 23

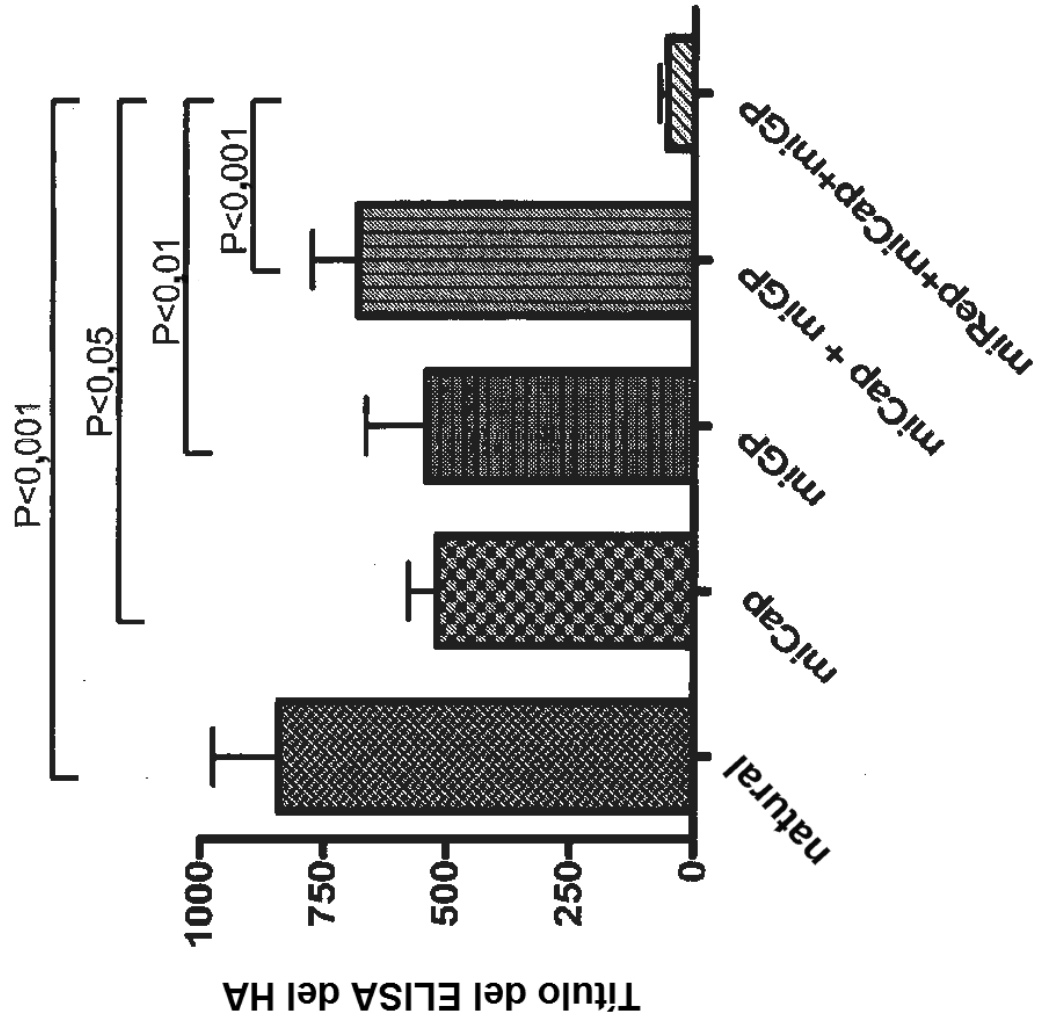


Figura 24

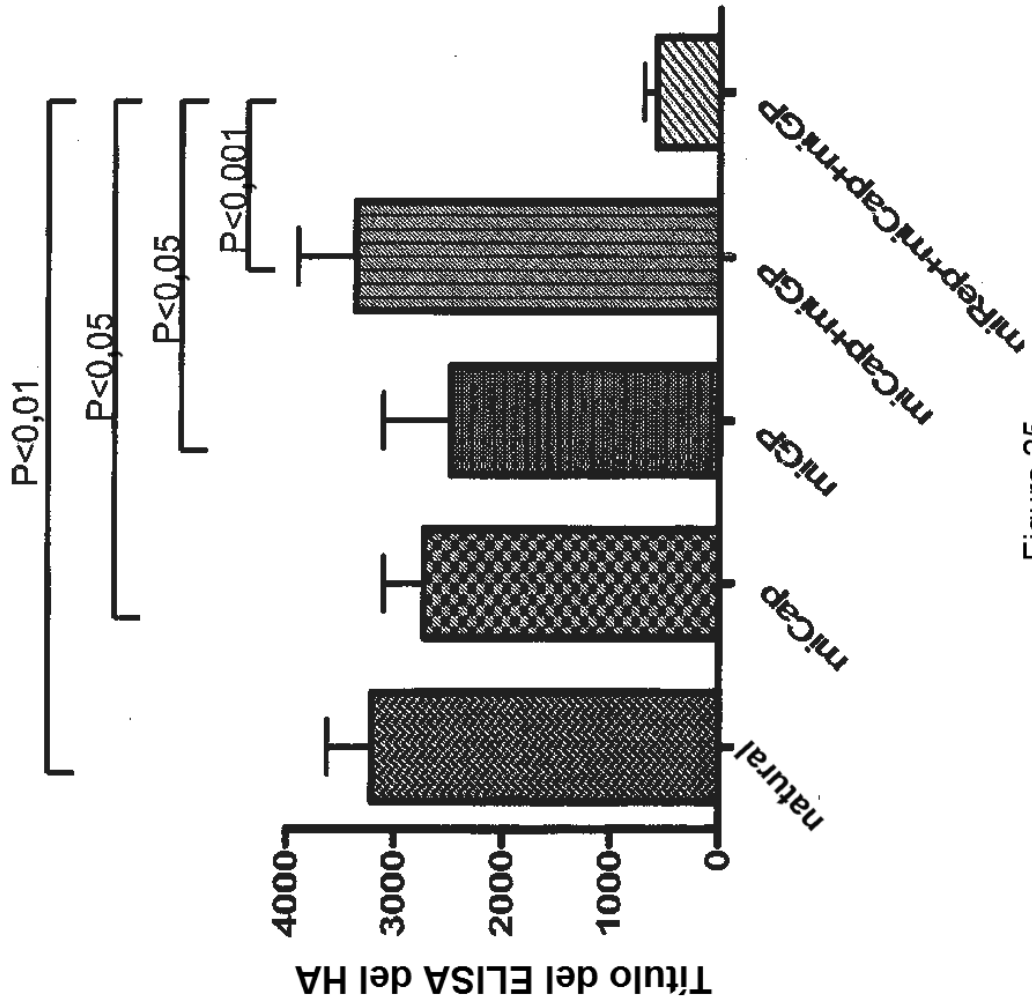


Figura 25

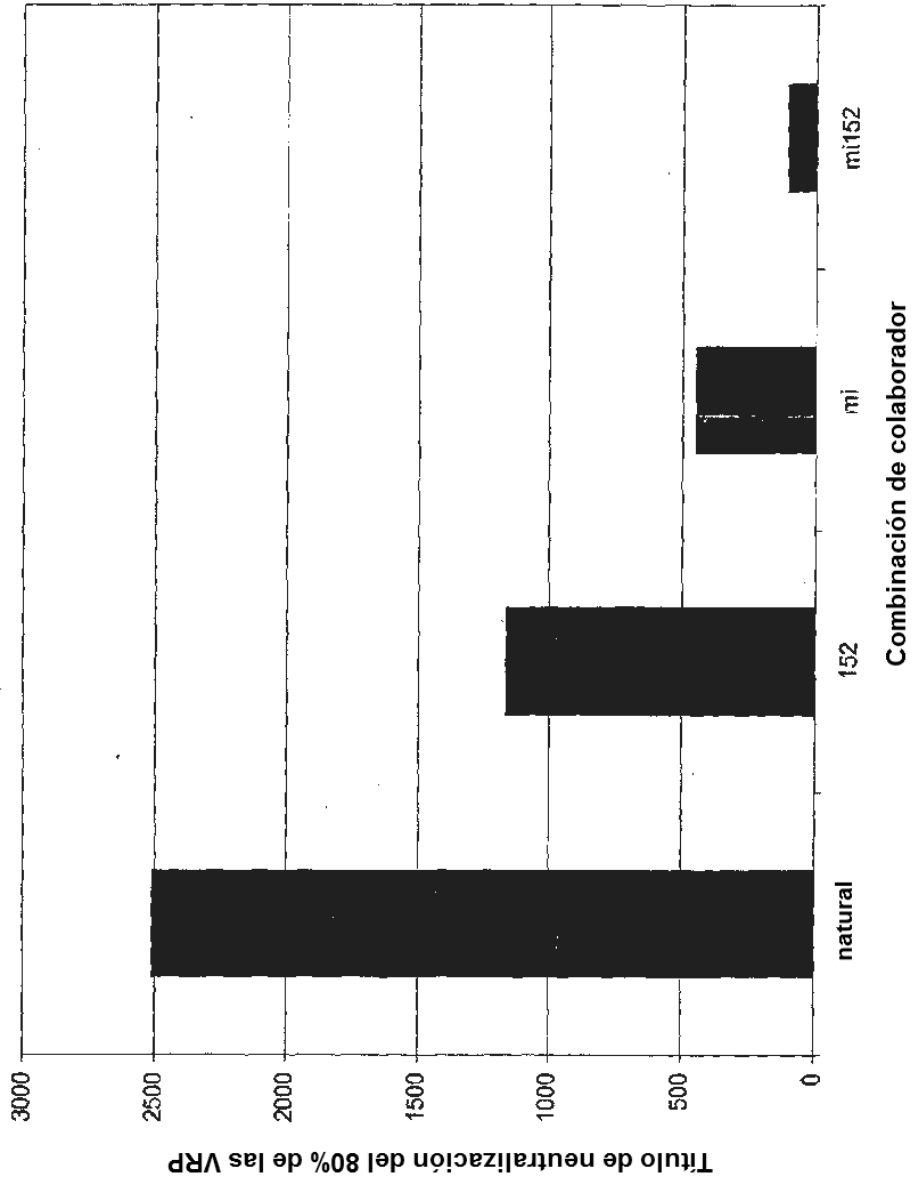


Figura 26

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • WO 2004085660 A [0006] [0018] [0029]
 • US 5185440 A [0016] [0017]
 • US 6008035 A [0016]
 • WO 9210578 A [0017]
 15 • US 5505947 A [0017]
 • US 5643576 A, Johnston [0017]
 • US 6190666 B, Garoff [0017]
 • US 5792462 A [0017]
 • US 6156558 A [0017]
 20 • US 6521235 A [0017]
 • US 6531135 A [0017]
 • US 6541010 A [0017]
 • US 7235235 A, Johnston [0017]
 25 • US 7045335 B [0017] [0018] [0026] [0029] [0043] [0074]
 • US 7078218 B, Smith [0017] [0041]
 • US 5814482 A [0017] [0046]
 • US 5843723 A [0017]
 • US 5789245 A [0017]
 • US 6015694 A [0017]
 • US 6105686 A [0017]
 • US 6376236 B, Dubensky [0017] [0027]
 • US 20020015945 A, Polo [0017]
 • US 20010016199 A, Johnston [0017]
 • US 20050266550 A, Rayner [0017] [0027]
 • US 20090075384 A, Kamrud [0018] [0023] [0029]
 • US 4650764 A, Temin [0022]
 • US 6242259 B [0024]
 • US 20070166820 A [0029]
 • US 7442381 B, Smith [0033]
 • WO 2006085983 A, Johnston [0041]
 • US 61118954 B [0106]

30 Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- PUSHKO et al. Replicon-Helper Systems from Attenuated Venezuelan Equine Encephalitis Virus: Expression of Heterologous Genes in Vitro and Immunization against Heterologous Pathogens in Vivo. *Virology*, 1997, vol. 239 (2), 389-401 [0003]
 35 • BARNES et al. Harnessing endogenous miRNAs to control virus tissue tropism as a strategy for developing attenuated virus vaccines. *Cell Host and Microbe*, 11 September 2008, vol. 4 (3), 239-248 [0004]
 40 • Engineering microRNA responsiveness to decrease virus pathogenicity. KELLY et al. *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 01 November 2008, vol. 14, 1278-1283 [0005]
 45 • POLO et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96 (8), 4598-603 [0013] [0017]
 50 • PUSHKO et al. *Virology*, 1997, vol. 239 (2), 389-401 [0013] [0078]
 • RAYNER et al. *Rev. Med. Virol*, 2002, vol. 12, 279-296 [0013]
 55 • GEIGENMULLER-GNIRKE et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88 (8), 3253-7 [0013] [0017]
 • WEISS ; SCHLESINGER. *J. Virol*, 1991, vol. 65 (8), 4017-25 [0013]
 • RAJU et al. *J. Virol*, 1995, vol. 69 (12), 7391-401 [0013] [0017]
 60 • HILL et al. *J. Virol.*, 1997, vol. 71 (4), 2693-704 [0013]
 • FROLOV et al. *J. Virol*, 1997, vol. 71 (4), 2819-29 [0013] [0017]
 • SMERDOU ; LILJESTROM. *J. Virol*, 1999, vol. 73 (2), 1092-8 [0013] [0017]
 • VÁLÓCZI et al. *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32 (22), e175 [0015]
 • KLOOSTERMAN et al. *PLoS Biol*, 2007, vol. 5 (8), e203 [0015]
 • FABIANI ; GAIT. *RNA*, 2008, vol. 14, 336-46 [0015]
 • PEDERSEN et al. *J. Virol.*, 1974, vol. 14, 40 [0016]
 • SCHLESINGER. The Togaviridae and Flaviviridae. Plenum Publishing Corp, 1986 [0016]
 • HAHN et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 2679-83 [0017]
 • FROLOV et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 11371-7 [0017]
 • PUSHKO et al. *Virology*, 1997, vol. 239, 389-401 [0017]
 • RAYNER et al. *Rev. Med. Virol.*, 2002, vol. 12, 279-96 [0017]
 • WEISS ; SCHLESINGER. *J. Virol.*, 1991, vol. 65 (8), 4017-25 [0017]
 • HILL et al. *J. Virol*, 1997, vol. 71 (4), 2693-704 [0017]
 • LONDON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 207-11 [0020]
 • DAVIS et al. *Microbiology*. 1990, 156-158 [0035]
 • OLMSTED et al. *Science*, 1984, vol. 225, 424 [0035]
 • JOHNSTON ; SMITH. *Virology*, 1988, vol. 162, 437 [0035]
 • WHITE et al. *J. Virology*, 2001, vol. 75, 3706 [0035]
 • KINNEY et al. *Virology*, 1989, vol. 70, 19 [0035]

65

- HEISE et al. *J. Virology*, 2000, vol. 74, 4207 [0035]
- BERNARD et al. *Virology*, 2000, vol. 276, 93 [0035]
- SMITH et al. *J. Virology*, 2001, vol. 75, 11196 [0035]
- 5 • HEIDNER ; JOHNSTON. *J. Virology*, 1994, vol. 68, 8064 [0035]
- KLIMSTRA et al. *J. Virology*, 1999, vol. 73, 10387 [0035]
- GLASGOW et al. *Virology*, 1991, vol. 185, 741 [0035]
- 10 • POLO ; JOHNSTON. *J. Virology*, 1990, vol. 64, 4438 [0035]
- SMERDOU ; LILJESTROM. *J. Virology*, 1999, vol. 73, 1092 [0035]
- 15 • KINNEY et al. *Virology*, 1989, vol. 170, 19-30 [0036]
- KUNKEL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 488 [0038]
- MILLER ; BUTTIMORE. *Mol. Cell. Biol.*, 1986, vol. 6 (8), 2895-902 [0058]
- 20 • MILLER ; ROSMAN. *BioTechniques*, 1989, vol. 7 (9), 980-90 [0058]
- BOSSELMAN et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1987, vol. 7 (5), 1797-806 [0058]
- 25 • MARKOWITZ et al. *J. Virol.*, 1988, vol. 62 (4), 1120-4 [0058]
- DANOS ; MULLIGAN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 6460-6464 [0058]
- KHROMYKH et al. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, 5967-77 [0059]
- SCHOLLE et al. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, 11605-14 [0059]
- YOSHII et al. *Vaccine*, 2005, vol. 23, 3946-56 [0059]
- MATTHIAS et al. *Cell*, 1997, vol. 90, 849-57 [0060]
- KAPADIA et al. *Virology*, 2008, vol. 376, 165-72 [0060]
- ANSARDI. *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 3684-90 [0060]
- INOUE et al. *J. Gene. Med.*, 2004, vol. 6, 1069-81 [0060]
- FARRELL et al. *J. Virol.*, 1994, vol. 68, 927-32 [0062]
- WEIR ; ELKINS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 9140-4 [0062]
- KAMRUD et al. *Virology*, 2007, vol. 360 (2), 376-87 [0076] [0077]
- REAP et al. *Vaccine*, 2007, vol. 25 (42), 7441-9 [0086]
- SEMPERE et al. *Genome Biol.*, 2004, vol. 5 (3), R13 [0087]
- BASKERVILLE ; BARTEL. *RNA*, 2005, vol. 11 (3), 241-7 [0087]
- FARH et al. *Science*, 2005, vol. 310 (5755), 1817-21 [0087]

30