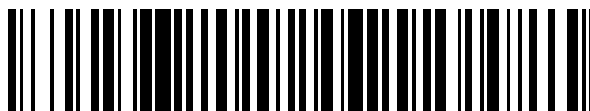


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 196**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C07K 14/18 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2005 E 05856741 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 1751290**

54 Título: **Constructos de encapsidación de replicones de alfavirus**

30 Prioridad:

25.05.2004 US 574025 P

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

08.01.2015

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.
(100.0%)
4560 HORTON STREET
EMERYVILLE, CA 94608, US**

72 Inventor/es:

**TANG, ZEQUN;
PERRI, SILVIA y
POLO, JOHN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 526 196 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).

Constructos de encapsidación de replicones de alfavirus**Descripción**5 CAMPO TECNICO

La presente invención se refiere de forma general a composiciones farmacéuticas. En particular, la invención se refiere a secuencias de amplificación de funcionamiento, que actúan en cis que son deficientes como señales de encapsidación y a métodos de hacer y usar estas secuencias.

10

ANTECEDENTES

15

Los alfavirus comprenden un conjunto de virus transmitidos por artrópodos genética, estructural y serológicamente relacionados de la familia *Togaviridae*. Se han clasificado veintiséis virus conocidos y subtipos de virus dentro del género alfavirus, incluyendo Virus Sindbis (SIN), virus Semliki Forest (SFV), virus del río Ross (RRV), y virus de la encefalitis equina venezolana (EEV).

20

25

Varios miembros del género alfavirus están siendo desarrollados como vectores de expresión de "replicones" para su uso como vacunas y terapéuticos. Los vectores de replicones pueden ser utilizados en varios formatos, incluyendo ADN, ARN y para hacer partículas similares a virus recombinantes que contienen los vectores de replicones (partículas de replicones). Tales vectores de replicones se han derivado de alfavirus que incluyen, por ejemplo, SIN (Xiong et al. (1989) Science 243:1188-1191; Dubensky et al., (1996) J. Virol. 70:508-519; Hariharan et al. (1998) J. Virol. 72:950-958; Polo et al. (1999) PNAS 96:4598-4603), Semliki Forest virus (Liljestrom (1991) Bio/Technology 9:1356-1361; Berglund et al. (1998) Nat. Biotech. 16:562-565), y VEE (Pushko et al. (1997) Virology 239:389-401). Un amplio conjunto de la bibliografía ha demostrado ahora la eficacia de usar vectores de replicones de alfavirus para aplicaciones como vacunas (ver por ejemplo, Dubensky et al., *ibid*; Berglund et al., *ibid*; Hariharan et al., *ibid*, Pushko et al., *ibid*; Polo et al., *ibid*; Davis et al. (2000) J Virol. 74:371-378; Schlesinger & Dubensky (1999) Curr Opin. Biotechnol. 10:434-439; Berglund et al. (1999) Vaccine 17:497-507).

30

El uso de de vectores de replicones de alfavirus como vacunas basadas en ácidos nucleicos puede proporcionar ciertas ventajas en comparación con otros vectores de expresión de ácidos nucleicos. A lo largo de los años, han emergido varios términos incluyendo vector de alfavirus, constructo de vector de alfavirus, replicón de alfavirus, replicón de ARN de alfavirus, Sistemas de Iniciación de Capas Vectoriales Eucariotas (ELVIS), replicón de plásmido de alfavirus y similares para describir los vectores de replicones de alfavirus.

35

40

45

50

Además de su uso como vehículos de administración de genes, los vectores de replicones de alfavirus también han sido descritas para su uso para generar partículas virales o partículas similares a virus (partículas de replicones), que son en sí mismas útiles en aplicaciones profilácticas y terapéuticas. Ver por ejemplo, Polo et al. (1999) Proc Natl Acad Sci USA 96(8):4598-4603. Las partículas de replicones de alfavirus se generan típicamente usando un sistema multi-componente que separa los varios elementos requeridos para la formación de partículas. La separación de los varios elementos reduce el riesgo de generar virus competentes con la replicación no deseables. El sistema incluye típicamente: 1) un vector de replicón, que contiene elementos necesarios para su propia replicación intracelular (por ejemplo, secuencias de codificación de proteínas no estructurales) pero carece de uno o más elementos codificantes de proteínas estructurales necesarios para la producción de partículas de la progenie, y 2) uno o más constructos de casetes de expresión de proteínas estructurales (por ejemplo, auxiliares defectuosos) que codifican proteínas estructurales de alfavirus (por ejemplo, cápside, glicoproteínas) requeridas para la encapsidación. Los constructos de replicones y los constructos de auxiliares defectuosos pueden ser introducidos directamente en células como ARNs o lanzadas desde ADN en células transfectadas o transitoriamente o establemente (por ejemplo líneas celulares de encapsidación o PCL). Ver por ejemplo, Polo et al. (1999) Proc. Nat'l Acad. Sci USA 96:4598-4603; Patentes U.S. N° 6,465,634; 6,426,196; 6,376,236; 6,342,372; 6,015,686 y 5,843,723. Dubensky, TW et al. (1996) J. Virology 70(1):508-519; Frolov et al. (1996). Proc Natl Acad Sci U S A. 93(21):11371-11377).

55

60

Idealmente, las poblaciones de partículas replicones de alfavirus usados en aplicaciones profilácticas o terapéuticas serán sustancialmente homogéneos y contendrán solamente el replicón de ADN. Sin embargo, incluso cuando los elementos de encapsidación están separados, pueden producirse partículas que contienen especies de ARN adicionales (por ejemplo ARN auxiliar defectuoso). Esta encapsidación no deseable de especies de ARN no de replicones también es denominada "co-encapsidación". La US 2004/0235133 divulga métodos para la producción a gran escala de replicones de alfavirus. Frolova et al. (J. Virol 1997 71(1):248-58) investiga la presencia de singlas de encapsidación en el genoma del virus Sindbis.

65

Así, a pesar de los avances en la tecnología de vectores alfavirales, sigue habiendo una necesidad de composiciones farmacéuticas que comprenden y métodos para hacer y usar vectores alfavirales y partículas de replicones de alfavirus, por ejemplo para reducir la co-encapsidación.

RESUMEN

La presente invención incluye composiciones que comprenden secuencias de amplificación que están modificadas para ser defectuosas como señales de encapsidación y métodos para hacer y usar estas composiciones.

En un aspecto, la invención incluye un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de amplificación 5' modificada con una longitud de entre 10 y 150 nucleótidos, en donde la secuencia modificada proporciona un sitio de reconocimiento para la síntesis de ARN de alfavirus de cadena positiva (del intermediario de ARN de cadena negativa complementario) pero no proporciona un sitio de reconocimiento para la encapsidación de ARN. En ciertas realizaciones, la secuencia de amplificación 5' modificada comprende una secuencia que muestra homología reducida (identidad de secuencia) con las señales de encapsidación a nivel de secuencia primario, mientras que la estructura secundaria sigue siendo la de la secuencia de amplificación original. En ciertas realizaciones, la secuencia de amplificación 5' modificada es ARN. Además, en ciertas realizaciones, la secuencia de amplificación 5' modificada comprende cualquiera de las SEQ ID NOS:4-16 o una secuencia que muestra al menos de alrededor del 50% a alrededor del 60% (o cualquier valor entre ellos, por ejemplo 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%) de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS:4 a 16, una secuencia que muestra al menos de alrededor del 60% a alrededor del 70% (o cualquier valor entre ellos, por ejemplo 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%) de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS:4 a 16, una secuencia que muestra al menos de alrededor del 70% a alrededor del 80% (o cualquier valor entre ellos, por ejemplo 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%) de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ IOD NOS:4 a 16, una secuencia que muestra al menos de alrededor del 80% a alrededor del 90% (o cualquier valor entre ellos, por ejemplo 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%) de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS:4 a 16, o una secuencia que muestra al menos de alrededor del 90% al 99% (o cualquier valor entre ellos, por ejemplo 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NOS:4 a 16.

En cualquiera de las secuencias de amplificación 5' modificadas descritas en la presente, la secuencia puede ser sintética y/o puede estar derivada de una secuencia seleccionada del grupo consistente de una secuencia 5' de alfavirus nativa, una secuencia 5' de alfavirus DI no nativa, una secuencia viral derivada no de alfavirus y una secuencia derivada de ARN celular, siempre que la secuencia modificada proporcione un sitio de reconocimiento para la síntesis del ARN de alfavirus de cadena positiva pero no proporcione un sitio de reconocimiento para la encapsidación del ARN. En ciertas realizaciones, la secuencia de amplificación 5' modificada comprende una secuencia que muestra menos de un 90% de identidad con una secuencia 5' de alfavirus nativa, una secuencia 5' de alfavirus DI no nativa, una secuencia viral derivada no de alfavirus o una secuencia derivada de ARN celular. En otras realizaciones, la secuencia de amplificación 5' modificada comprende una secuencia que muestra menos de un 70% de identidad de secuencia con una secuencia 5' de alfavirus nativa, una secuencia 5' de alfavirus DI no nativa, una secuencia viral derivada no de alfavirus o una secuencia derivada de ARN celular. Todavía en otras realizaciones, la secuencia de amplificación 5' modificada comprende una secuencia que muestra menos de un 60% de identidad de secuencia con una secuencia 5' de alfavirus nativa, una secuencia 5' de alfavirus DI no nativa, una secuencia viral derivada no de alfavirus o una secuencia derivada de ARN celular. En otras realizaciones, la secuencia de amplificación 5' modificada comprende una secuencia que muestra al menos entre alrededor del 40% y alrededor del 50% (o cualquier valor entre ellos, por ejemplo 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%) de identidad de secuencia con una secuencia 5' de alfavirus nativa, una secuencia 5' de alfavirus DI no nativa, una secuencia viral derivada no de alfavirus o una secuencia derivada de ARN celular. Todavía en otras realizaciones, la secuencia de amplificación 5' modificada comprende una secuencia que muestra al menos entre alrededor del 30% y alrededor del 40% (o cualquier valor entre ellos, por ejemplo 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%) de identidad de secuencia con una secuencia 5' de alfavirus nativa, una secuencia 5' de alfavirus DI no nativa, una secuencia viral derivada no de alfavirus o una secuencia derivada de ARN celular. Todavía en otras realizaciones, la secuencia de amplificación 5' modificada comprende una secuencia que muestra menos de alrededor del 30% de identidad de secuencia con una secuencia 5' de alfavirus nativa, una secuencia 5' de alfavirus DI no nativa, una secuencia viral derivada no de alfavirus o una secuencia derivada de ARN celular.

En otro aspecto, la invención comprende un constructo de vector de ARN que comprende cualquiera de las secuencias de amplificación 5' como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, el constructo del vector puede comprender además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un promotor de la región de unión de alfavirus; una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus (por ejemplo, glicoproteínas E1 y/o E2; proteínas de la cápside; etc.); y/o una secuencia de reconocimiento de polimerasa de ARN. Además, el constructo del vector puede también comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable. Cualquiera de los constructos de vectores de ARN descritos en la presente puede codificar menos de todas la proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas. Además, cualquiera de los constructos de vectores descritos en la presente puede incluir secuencias derivadas de más de un alfavirus.

En otro aspecto, la invención incluye un constructo de vector de alfavirus que comprende un promotor 5'

ligado operativamente a una molécula de ácido nucleico, en donde dicha molécula de ácido nucleico es ADN complementario a los vectores de ARN como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, los constructos de vectores pueden comprender además una secuencia 3' que controla la terminación de la transcripción. El promotor 5' puede ser un promotor procariota o uno eucariota.

5 Todavía en otro aspecto, la invención incluye una célula que comprende cualquiera de los constructos de vectores de alfavirus como se reivindica en la presente.

10 Todavía en otro aspecto, la invención incluye una línea celular de encapsidación de alfavirus que comprende una célula huésped y uno o más de los vectores de alfavirus como se reivindica en la presente.

15 En un aspecto adicional, la invención incluye una célula auxiliar para producir una partícula de alfavirus infecciosa, defectuosa (defectuosa en replicación), que comprende en una célula permisiva a alfavirus: un vector de replicón de alfavirus; y uno o más casetes de expresión separados (por ejemplo constructos auxiliares) que codifican las proteínas estructurales del alfavirus ausentes del vector del replicón, en donde al menos uno de los mencionados constructos auxiliares separados comprende una secuencia de amplificación 5' modificada reivindicada en la presente y además en donde la expresión combinada del vector del replicón y el casete de expresión de proteína estructural separado (por ejemplo vectores auxiliares) produce una partícula de alfavirus ensamblada que comprende una o más secuencias heterólogas, es capaz de infectar una célula, y es incapaz de completar la replicación viral. En ciertas realizaciones, la célula auxiliar comprende dos constructos de casete de expresión de proteína estructural separados (por ejemplo constructos auxiliares), en donde un primer casete de expresión de proteína estructural o constructo auxiliar codifica una proteína de la cápside de alfavirus y un segundo casete de expresión de proteína estructural o constructo auxiliar codifica glicoproteínas de alfavirus. Uno o más de los casetes de expresión de proteína estructural separado o constructos auxiliares pueden comprender una secuencia de amplificación 5' modificada con una longitud de entre 10 y 150 nucleótidos. Preferiblemente, la célula auxiliar está transfectada con los vectores de replicones de alfavirus y el uno o más constructos auxiliares del casete de expresión de proteína estructural.

30 En otro aspecto, la invención incluye un método de hacer partículas de alfavirus infecciosas, defectuosas (defectuosas en replicación) como se define en las reivindicaciones, que comprende: (a) proporcionar una célula auxiliar como se reivindica en la presente; (b) producir las partículas de alfavirus en la célula auxiliar; y (c) recoger las partículas de alfavirus de la célula auxiliar.

35 En otro aspecto, la invención incluye una composición como se define en las reivindicaciones, que comprende partículas de alfavirus, infecciosas, defectuosas en replicación producidas de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente, en donde la composición está libre de partículas de alfavirus competentes en replicación detectables.

40 Todavía en otros aspecto, la invención incluye una formulación farmacéutica como se define en las reivindicaciones, que comprende partículas de alfavirus defectuosas en replicación, infecciosas producidas por cualquiera de los métodos descritos en la presente en un portador farmacéuticamente aceptable.

45 En otro aspecto adicional, la invención incluye un método para hacer cualquiera de las secuencias de amplificación 5' modificadas como se define en las reivindicaciones, el método comprende los pasos de (a) determinar regiones de homología de secuencia entre una secuencia de amplificación 5' conocida y una secuencia que contiene una señal de encapsidación viral; y (b) alterar la secuencia primaria de la secuencia de amplificación 5' conocida de tal forma que la homología con la secuencia que contiene la señal de encapsidación viral se reduce pero la función de amplificación se mantiene, haciendo de esta manera una secuencia de amplificación 5' modificada. En ciertas realizaciones, la secuencia de amplificación 5' conocida es seleccionada del grupo consistente de una secuencia 5' nativa, un extremo 5' de alfavirus DI no nativo, una secuencia viral derivada no de alfavirus y una secuencia derivada de ARN celular.

55 Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención serán evidentes en referencia a la siguiente descripción detallada y varias referencias expuestas en la presente que describen con más detalle ciertos procedimientos o composiciones (por ejemplo plásmidos, secuencias, etc.).

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

60 La Figura 1 es una representación esquemática de un sistema de constructos múltiple para generar partículas de replicones de alfavirus. El vector de replicón incluye secuencias de replicación cis del extremo 5' y 3', genes no estructurales de alfavirus, promotor de la región de unión subgenómica (JR) y un gen de interés heterólogo (GOI). los casetes de expresión de proteínas estructurales (ayudantes defectuosos) representados incluyen una secuencia de amplificación 5' de ARNt-asparagina actuando en cis (ARNt_{asp} o ARNt_{asp}), un promotor de la región de unión subgenómica (JR), secuencias de replicación del extremo cis y secuencias

que codifican la cápside o glicoproteína.

La Figura 2 representa el alineamiento de una porción de una señal de encapsidación Sindbis (SIN) putativa (SEQ ID NO: 1) con una secuencia 5' de ARN_t_{asp} (SEQ ID NO:2). La línea inferior muestra la secuencia de consenso (SEQ ID NO: 3), y muestra una región de homología alta que se extiende desde alrededor de los

5 nucleótidos 1029 a 1050 de un genoma SIN (Nº de Acceso del GENbank NC001547).

La Figura 3 representa el alineamiento de una secuencia 5' de ARNt no modificada (SEQ ID NO: 2) con varias secuencias de ARNt modificadas ejemplares (SEQ ID NOs:4-15). Los nucleótidos que están alterados con respecto a la secuencia de ARN_t_{asp} del tipo salvaje están subrayados.

10 Las Figuras 4A y 4B son representaciones esquemáticas de la estructura secundaria formada por secuencias de amplificación 5' modificadas y no modificadas. La Figura 4A muestra la estructura secundaria del ARN_t_{asp} no modificada (tipo salvaje) (SEQ ID NO:2) y la Figura 4B muestra la estructura secundaria de una secuencia de amplificación 5' modificada ejemplar, denominada mod#1 (SEQ ID NO:4).

15 Las Figuras 5A y 5B son gráficos que representan la co-encapsidación de constructos auxiliares en partículas y muestran que una secuencia de amplificación 5' modificada reduce eficazmente la co-encapsidación de constructos auxiliares que comprenden la secuencia modificada con efectos mínimos en el rendimiento de partículas. La Figura 5A muestra los resultados a una multiplicidad de infección 2 (MOI 2). La figura 5B muestra los resultados a una MOI 4.

20 La Figura 6 es un gráfico que representa la infectividad de partículas hechas usando casetes estructurales que contienen o secuencias de amplificación modificadas (gris claro) o secuencias de ARNt no modificadas (gris oscuro). La MOI se muestra a lo largo del eje horizontal.

DESCRIPCION DETALLADA

25 Se describen en la presente composiciones y métodos para generar partículas alfavirales (partículas de replicones). Específicamente, se describen secuencias de amplificación 5' modificadas. Las secuencias de amplificación 5' modificadas encuentran uso en constructos de proteínas estructurales de alfavirus (por ejemplo, constructos auxiliares), líneas celulares de encapsidación y similares.

30 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales, de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro del estado de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Ver por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); and Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989); Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997); Short Protocols in Molecular Biology, 4ª ed. (Ausubel et al. eds., 1999, John Wiley & Sons); Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., eds., 1998, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton & Graham eds., 1997, Springer Verlag); Peters and Dalrymple, Fields Virology (2ª ed), Fields et al. (eds.), B.N. Raven Press, New York, NY.

40 Como se usa en esta especificación y las reivindicaciones añadidas, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una secuencia" incluirá dos o más de dichas secuencias.

45 DEFINICIONES

Antes de exponer invención, se exponen definiciones de ciertos términos que serán usados en lo sucesivo.

50 Una molécula de "ácido nucleico" o "polinucleótido" puede incluir, pero no está limitada a, secuencias de ADN o ARN procariontas, ARNm eucariota u otro ARN, ADNc de ARNm eucariota u otro ARN, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (por ejemplo, mamífero), secuencias de ADN o ARN sintéticas, ARN transcrito de cualquiera de los ADNs anteriores y combinaciones de los anteriores. El término también abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN e incluye modificaciones como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), a la secuencia nativa. Estas modificaciones

55 pueden ser deliberadas, como a través mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales. Las modificaciones de polinucleótidos pueden tener cualquier número de efectos incluyendo, por ejemplo, facilitar la expresión del producto de polipéptido en una célula huésped. Un polinucleótido puede incluir tanto secuencias monocatenarias como bicatenarias y se refiere a, pero no está limitado a, ADNc de ARNm viral, procarionta o eucariota, secuencias de ADN y ARN genómicos de ADN viral (por ejemplo virus y retrovirus de ARN y ADN) o procarionta, secuencias de

60 ARN o ADN sintéticas. El término también abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base de ADN y ARN.

Una "molécula de ácido nucleico aislada" o "polinucleótido aislado" se refiere a cualquier polinucleótido que está separado y discreto de un organismo completo con el que está normalmente asociado y/o ha sido retirado de su

65 entorno original (por ejemplo, el entorno natural si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido de origen

natural no está aislado, pero el mismo polinucleótido separado de alguno o todos de los materiales coexistentes en el sistema natural está aislado. Dicho polinucleótido podría ser parte de un vector y/o dicho polinucleótido podría ser parte de una composición, y todavía estar aislado si ese vector o composición no es parte de su entorno natural. Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico aisladas son aquellas que no están integradas en el ADN genómico de un organismo o, en el caso de un virus, están separadas del genoma del virus completo así como una molécula de ácido nucleico químicamente sintetizado, o una molécula de ácido nucleico que es producida por técnicas recombinantes (por ejemplo, PCR).

"ARN subgenómico" se refiere a una molécula de ARN de una longitud o tamaño que es más pequeño que el del ARN genómico del que se deriva. El ARN genómico es transcrito desde un promotor interno cuyas secuencias residen dentro del ARN genómico o su complemento. En las realizaciones preferidas, el ARN subgenómico se produce de un constructo de vector de alfavirus, replicón de vector de ARN, o constructo auxiliar defectuoso y codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus u otras secuencias de interés heterólogas. Generalmente, el ARN subgenómico se asemeja a ARNm típico con regiones no traducidas del extremo 5' y 3' y un marco de lectura abierto que codifica proteínas.

Como se usa en la presente, la frase "constructo de vector" se refiere de forma general a cualquier ensamblaje que es capaz de dirigir la expresión de una secuencia(s) de ácidos nucleicos o gen(es) de interés. El constructo de vector incluye típicamente un promotor/potenciador transcripcional o elemento(s) que definen el locus, u otros elementos que controlan la expresión génica por otros medios como empalme alternativo, exportación de ARN nuclear, modificación post-transcripcional de proteína. Además, el constructo de vector incluye típicamente una secuencia que, cuando se transcribe, está ligada operativamente a la secuencia(s) o gen(es) de interés y actúa como una secuencia de iniciación de traslación. Por ejemplo, el vector puede contener una o más secuencias promotoras 5' (por ejemplo promotores de polimerasa de ARN dependientes de ADN) que inician la síntesis, incluyendo promotores derivados de organismos tanto procariotas como eucariotas, por ejemplo, los promotores de β -galactosidasa y *trpE* bacterianos, y promotores del virus de simio viral eucariota 40 (SV40) (por ejemplo, temprano o tardío), citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, inmediato temprano), virus de leucemia murino Moloney (MoMLV) o virus de sarcoma de Rous (RSV) LTR, y virus simple de herpes (HSV) (timidina quinasa). El constructo de vector puede también incluir opcionalmente una señal que dirige la poliadenilación, un marcador seleccionable, así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de la traslación. Ejemplos de constructos de vectores incluyen los vectores ELVIS, que comprende el complemento de ADNc de constructos de vectores de ARN, los mismos constructos de vectores de ARN, constructos de vectores de alfavirus, constructos de vectores de CMV y similares.

"Constructo de vector de alfavirus" se refiere a un ensamblaje que es capaz de dirigir la expresión de una secuencia o gen de interés. Dichos constructos de vectores están comprendidos de una secuencia 5' que es capaz de iniciar la transcripción de un ARN de alfavirus (también referido como elementos de la secuencia de nucleótidos conservada 5' (CSE) o secuencia de replicación en cis 5' que es capaz de iniciar la transcripción de un ARN de alfavirus), así como secuencias que, cuando se expresan, codifican para proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas (por ejemplo, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4), y secuencia de reconocimiento de polimerasa de ARN de alfavirus (también referida como 3' CSE o secuencia de replicación en cis 3', y opcionalmente un tracto de poliadenilato. Además, el constructo de vector puede incluir un promotor de la "región de unión" subgenómica viral, secuencias de uno o más genes de proteínas estructurales o porciones de los mismos, molécula(s) de ácidos nucleicos extracutáneas que son de un tamaño suficiente para permitir la producción de partículas similares a virus (por ejemplo, partículas de replicones), un promotor 5' que es capaz de iniciar la síntesis de ARN viral de ADNc *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, dentro de una célula eucariota), una secuencia heteróloga a ser expresada, y uno o más sitios de restricción para la inserción de secuencias heterólogas.

"Vector de replicón de ARN de alfavirus", "vector de replicón de ARN", "vector de replicón" o "replicón" se refiere a una molécula de ARN que es capaz de dirigir su propia amplificación o auto-replicación *in vivo*, dentro de una célula objetivo. Para dirigir su propia amplificación, la molécula de ARN debería codificar los enzimas necesarios para catalizar la amplificación de ARN (por ejemplo, proteínas no estructurales de alfavirus nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) y también contiene secuencias de ARN en cis requeridas para la replicación que son reconocidas y utilizadas por las enzimas codificadas. Un replicón de vector de ARN de alfavirus debería contener los siguientes elementos ordenados: secuencias celulares o virales 5' requeridas para la amplificación mediada por proteínas no estructural (también puede ser referida como 5' CSE, o secuencia de replicación en cis 5', o secuencias virales 5' requeridas en cis para la replicación, o secuencia 5' que es capaz de iniciar la transcripción de un alfavirus), secuencias que, cuando se expresan, codifican para proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas (por ejemplo, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4), y secuencias celulares o virales 3' requeridas para la amplificación mediada por proteínas no estructural (también puede ser referida como 3' CSE, o secuencias virales 3' requeridas en cis para la replicación, o una secuencia de reconocimiento de polimerasa de ARN de alfavirus). El replicón de vector de ARN de alfavirus puede contener cualquier medio para expresar una o más secuencias heterólogas, como por ejemplo un IRES o un promotor subgenómico viral (por ejemplo, alfaviral) (por ejemplo, promotor de la región de unión) que puede, en ciertas realizaciones, ser modificado para aumentar o reducir la transcripción viral del fragmento subgenómico, o para disminuir la homología con casetes de expresión de proteínas estructurales o auxiliares defectuosas, y una o

más secuencias heterólogas a ser expresadas. Un replicón puede contener también secuencias adicionales, por ejemplo, una o más secuencias heterólogas que codifican uno o más polipéptidos (por ejemplo, un gen que codifica a la proteína o un gen 3' proximal) y/o un tracto poliadenilato. El replicón no debería contener secuencias que codifiquen todas las proteínas estructurales del alfavirus (cápside, E1, E2). Ejemplos no limitativos de secuencias heterólogas que pueden ser expresadas por vectores de replicones se describen, por ejemplo en la Patente U.S: N° 6.015.686 e incluyen, por ejemplo, antígenos, linfoquinas, citoquinas, etc.

Una "señal de encapsidación" o "secuencia de encapsidación" se refiere a una secuencia que actúa en cis que está implicada en la incorporación de nucleótidos (por ejemplo, ARN o ADN genómico) en partículas virales (viriones). Se han descrito las señales de encapsidación de muchos virus. Ver, por ejemplo, Youil R. et al.(2003) Human gene therapy 14(10):1017-1034; Beasley BE et al(2002) J. of Virology 76(10):4950-4960; Watanabe T et al.(2003) J. of Virology 77(19):10575-10583.

"Partícula de alfavirus recombinante" o "partícula de replicón" se refiere a una unidad estructural similar a viriones que contiene un replicón de vector de ARN de alfavirus. Generalmente, una partícula de alfavirus recombinante comprende una o más proteínas estructurales de alfavirus, una envoltura lípida y un replicón de vector de ARN. Preferiblemente, la partícula de alfavirus recombinante contiene una estructura de nucleocápside que está contenida dentro de bicapa lípida derivada de células huésped, como una membrana de plasma, en la que las glicoproteínas de la envoltura alfaviral-codificada están embebidas. La partícula puede también contener otros componentes (por ejemplo, elementos de focalización, otras proteínas estructurales virales, u otros ligandos que enlazan con los receptores) que dirigen el tropismo de la partícula de la que se derivó el alfavirus.

"Casete de expresión de proteína estructural de alfavirus" se refiere a un constructo de vector que es capaz de expresar una o más proteínas estructurales de alfavirus. El casete de expresión de proteína estructural de alfavirus puede ser un "constructo auxiliar defectuoso" que es capaz de la replicación o amplificación del ARN, y puede expresar una o más proteínas estructurales de alfavirus en respuesta a proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas suministradas en trans. El constructo auxiliar defectuoso contiene típicamente los siguientes elementos ordenados: una secuencia de replicación en cis o amplificación 5', un promotor de la región de unión subgenómica viral, secuencias que, cuando se expresan, codifican para una o más proteínas estructurales de alfavirus biológicamente activas (por ejemplo, C, E3, E2, 6K, E1), secuencias de replicación en cis o amplificación 3', y un tracto de poliadenilato. El constructo auxiliar defectuoso puede también contener un promotor 5' que es capaz de iniciar la síntesis de ARN viral de ADNc in vitro o in vivo (por ejemplo, en una célula eucariota), una secuencia 3' que controla la terminación de la transcripción, secuencias de reconocimiento de empalme, una secuencia de procesamiento de ribozima catalítica, una secuencia que codifica un marcador seleccionable y/o una señal de exportación nuclear. Un constructo auxiliar defectuoso no debería codificar para las cuatro proteínas no estructurales de alfavirus funcionales.

Los términos "secuencias celulares o virales 5' requeridas para la amplificación medida por proteínas no estructurales" y "secuencias 5' requeridas para la amplificación mediada por proteínas no estructurales" y "secuencias de amplificación" y "secuencias de amplificación 5'" y "5' CSE" y "secuencias virales 5' requeridas en cis para la replicación" y "secuencia 5' que es capaz de iniciar la transcripción de un alfavirus" se usan de manera intercambiable para referirse a un elemento funcional que proporciona un sitio de reconocimiento en el que el virus o el vector derivado de virus sintetiza ARN de cadena positiva. Así, puede ser un complemento de la secuencia real contenida dentro del virus o vector, que se corresponde con el extremo 3' de la copia de ARN de cadena negativa, que está enlazada por el complejo de replicasa de proteína no estructural, y posiblemente factores de células huésped adicionales, de la que se inicia la transcripción del ARN de cadena positiva. Se han utilizado una amplia variedad de secuencias como secuencias de amplificación incluyendo, por ejemplo, regiones no traducidas (NTR) del extremo 5' de alfavirus y otras secuencias adyacentes, como por ejemplo secuencias a través de los nucleótidos 210, 250, 300, 350, 400 ó 500 de un genoma de alfavirus. Alternativamente, por ejemplo en el caso de vectores Sindbis (SIN), se han usado nucleótidos no de alfavirus 10-75 para Asparagina de ARNt (ARNt_{asp}) (Schlesinger et al., Patente U.S: N° 5.091.309).

Como se usa en la presente, el término "secuencia de amplificación modificada 5'" se refiere a una molécula de nucleótido (ARN o ADN) que comprende una secuencia de amplificación como se describe anteriormente, cuya estructura (secuencia) primaria ha sido modificada (por ejemplo, sustituciones, adiciones, deleciones) en comparación con las señales de amplificación conocidas, de tal manera que las secuencias modificadas son defectuosas como señal de encapsidación pero mantienen su funcionalidad de amplificación (replicación). Por ejemplo, las secuencias de amplificación modificadas pueden incluir homología reducida a señales de encapsidación al nivel de secuencia primario, mientras que la estructura secundaria sigue siendo la de la secuencia de amplificación original. Las secuencias de amplificación modificadas pueden incluir además secuencias adicionales, siempre que se mantenga la estructura secundario y/o la capacidad de amplificación de actuación en cis.

El término "gen 3' proximal" se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, que está contenida dentro de un vector de replicón, Sistema de Iniciación de Vectores Estratificados Eucariotas, ARN auxiliar

defectuosos o casete de expresión de proteínas estructurales, y localizada dentro de una posición específica en relación a otro elemento. La posición de este gen 3' proximal debería ser determinada respecto a la secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteínas no estructurales (definida anteriormente), en donde el gen 3' proximal es la secuencia 5' que codifica a la proteína (hacia arriba) de, y que precede inmediatamente a este elemento.

El término "promotor subgenómico viral" se refiere a una secuencia del origen del virus que, junto con las polimerasa celular y viral y otros factores, permite la transcripción de una molécula de ARN de menos de la longitud del genoma. Para un promotor subgenómico de alfavirus (alfaviral) o promotor de la región de unión subgenómica de alfavirus (alfaviral), esta secuencia está derivada generalmente de la región entre los marcos de lectura abiertos (ORFs) de proteínas estructurales y no estructurales y controla normalmente la transcripción del ARNm subgenómico. Típicamente, el promotor subgenómico de alfavirus consiste de una secuencia de núcleo que proporciona la mayoría de la actividad asociada al promotor, así como las regiones de flanco (por ejemplo, promotor nativo o extendido) que además potencian la actividad asociada al promotor. El promotor subgenómico puede ser un complemento de la secuencia real contenida dentro del virus o vector, que corresponde con la región en una copia del ARN de cadena negativa y que promueve el inicio de la transcripción del ARNm subgenómico de cadena positiva. Por ejemplo, en el caso del prototipo de alfavirus, virus Sindbis, el promotor de la región de unión subgenómica normal empieza típicamente en aproximadamente el nucleótido número 7579 y continúa a través de al menos el nucleótido número 7612 (y posiblemente más allá). En un mínimo, se cree que los nucleótidos 7579 a 7602 sirven como la secuencia del núcleo necesaria para la transcripción del fragmento subgenómico.

Los términos "secuencias celulares o virales 3' requeridas para la amplificación mediada por proteínas no estructurales" o "secuencias 3' requeridas para la amplificación mediada por proteínas no estructurales" se usan de manera intercambiable con los términos 3' CSE, o secuencias de replicación en cis 3', o secuencias virales 3' requeridas en cis para la replicación, o una secuencia de reconocimiento de polimerasa de ARN de alfavirus. Esta secuencia es un elemento funcional que proporciona un sitio de reconocimiento en el que el virus o vector derivado de virus comienza la replicación (amplificación) por la síntesis de la cadena de ARN negativa. Se pueden utilizar una amplia variedad de secuencias para esta función. Por ejemplo, la secuencia puede incluir una región no traducida (NTR) del extremo 3' de alfavirus completa, como por ejemplo, con SIN, que incluiría los nucleótidos 11.647 a 11.703. o una región truncada de la NTR 3', que mantiene todavía su función como una secuencia de reconocimiento (por ejemplo, nucleótidos 11.684 a 11.703). Ver por ejemplo, Patente U.S. N° 6.329.210. Otros ejemplos de secuencias que se pueden utilizar en este contexto incluyen, pero no están limitadas a, secuencias no de alfavirus u otras secuencias que mantienen una capacidad funcional similar para permitir el inicio de la síntesis del ARN de cadena negativa (por ejemplo, las secuencias descritas en George et al., (2000) J. Virol. 74:9776-9785).

"Transformación estable" se refiere a la introducción de una molécula de ácido nucleico en una célula viva, y el mantenimiento a largo plazo y permanente de esa molécula de ácido nucleico en las células de la progenie a través de ciclos sucesivos de división celular. La molécula de ácido nucleico puede ser mantenida en cualquier compartimento celular incluyendo, pero no limitado a, el núcleo, mitocondria o citoplasma. En realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico se mantiene en el núcleo. El mantenimiento puede ser intracromosómico (integrado) o extracromosómico, como un evento episómico.

"Línea celular de encapsidación de alfavirus" se refiere a una célula que contiene el casete de expresión de proteínas estructurales de alfavirus y que produce partículas de alfavirus recombinantes después de la introducción de un constructo de vector de alfavirus, replicón de vector de ARN, sistema de iniciación del vector estratificado eucariota (por ejemplo, Patente U.S. N° 5.814.482), o partícula de alfavirus recombinante. La célula parental puede ser de origen mamífero o no mamífero. Dentro de las realizaciones preferidas, la línea celular de encapsidación es transformada establemente con el casete de expresión de proteínas estructurales.

"Ligado operativamente" se refiere a una disposición de elementos en donde los componentes descritos están configurados para realizar su función habitual. Así, un promotor dado ligado operativamente a una secuencia de codificación es capaz de efectuar la expresión de la secuencia de codificación cuando están presentes las enzimas apropiadas. El promotor no necesita ser contiguo con la secuencia de codificación, siempre que funciones para dirigir la expresión del mismo. Así, por ejemplo, puede haber presentes secuencias transcritas no traducidas intervinientes entre la secuencia promotora y la secuencia de codificación y la secuencia promotora puede ser todavía considerada "ligada operativamente" a la secuencia de codificación.

Dos o más secuencias de polinucleótidos pueden ser comparadas determinando su "porcentaje de identidad". De igual manera dos o más secuencias de aminoácidos pueden ser comparadas determinando su "porcentaje de identidad". El porcentaje de identidad de dos secuencias, ya sean secuencias de ácidos nucleicos o péptidos, se describe generalmente como el número de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas dividido por la longitud de la secuencia más corta y multiplicado por 100. Un alineamiento aproximado para secuencias de ácidos nucleicos se proporciona por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981). Este algoritmo puede ser extendido para su uso con secuencias de péptidos usando la matriz de puntuación desarrollada por Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M.O.

Dayhoff ed., 5 suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA y normalizada por Gribskov, Nucl. Acids Res. 14(6):6745-6763 (1986). Una implementación de este algoritmo para secuencias de ácidos nucleicos y péptidos se proporciona por Genetics Computer Group (Madison, WI) en su aplicación de utilidades BestFit. Los parámetros por defecto para este método se describen en el Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Version 8 (1995) (disponible de Genetics Computer Group, Madison, WI). Se conocen generalmente en la técnica otros programas igualmente adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias.

Por ejemplo, el porcentaje de identidad de una secuencia de nucleótidos particular con una secuencia de referencia puede ser determinado usando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuación por defecto y una penalización por hueco de seis posiciones de nucleótidos. Otro método de establecer un porcentaje de identidad en el contexto de la presente invención es el uso del paquete de programas MPSRCH con copyright de la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). De este conjunto de paquetes, se puede emplear el algoritmo de Smith-Waterman cuando se usan los parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización por abertura de hueco de 12, penalización por extensión de hueco de uno, y un hueco de seis). De los datos generados, al valor "Concordancia" refleja "identidad de secuencia". Otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias son conocidos generalmente en la técnica, como el programa de alineamiento BLAST, que también puede ser usado con parámetros por defecto. Por ejemplo, BLASTN y BLASTP pueden ser usados con los siguientes parámetros por defecto: código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; punto de corte = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenar por = PUNTUACION MAS ALTA; Bases de datos = no redundantes, GenBank +EMBL + DDBJ + PDB + translaciones de CDS del GenBank + proteína Suiza + Spupdate +PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de internet: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

Alguien experto en la técnica puede determinar fácilmente los parámetros de búsqueda apropiados para su uso para una secuencia dada en los programas anteriores. Por ejemplo, los parámetros de búsqueda pueden variar en base al tamaño de la secuencia en cuestión. Así, por ejemplo, una realización representativa de la presente invención incluiría un polinucleótido aislado que tiene X nucleótidos contiguos, en donde (i) los X nucleótidos contiguos tienen al menos alrededor del 50% de identidad con los Y nucleótidos contiguos derivados de cualquiera de las secuencias descritas en la presente, (ii) X es igual a Y, y (iii) X es mayor que o igual a 6 nucleótidos y hasta 5000 nucleótidos, preferiblemente mayor que o igual a 8 nucleótidos y hasta 500 nucleótidos, más preferiblemente 10-12 nucleótidos y hasta 5000 nucleótidos, e incluso más preferiblemente 15-20 nucleótidos, hasta el número de nucleótidos presentes en las secuencias de longitud completa descritas en la presente (por ejemplo, ver el Listado de Secuencias en las reivindicaciones), incluyendo todos los valores enteros comprendidos en los intervalos anteriormente descritos.

Se considera que dos fragmentos de ácidos nucleicos "hibridan selectivamente" como se describe en la presente. El grado de identidad de secuencia entre dos moléculas de ácidos nucleicos afecta a la eficiencia y fuerza de los eventos de hibridación entre dichas moléculas. Una secuencia de ácidos nucleicos parcialmente idéntica inhibirá al menos parcialmente una secuencia completamente idéntica de hibridar con una molécula objetivo. La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente idéntica puede ser evaluada usando ensayos de hibridación que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Southern blot, Northern blot, hibridación de solución, o similares, ver Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.). Dichos ensayos pueden ser realizados usando varios grados de selectividad, por ejemplo, usando condiciones que varían de rigurosidad baja a alta. Si se emplean condiciones de rigurosidad baja, la ausencia de enlace no específico se puede evaluar usando una sonda secundaria que carece incluso de un grado parcial de identidad de secuencia (por ejemplo, una sonda que tiene menos de alrededor del 30% de identidad de secuencia con la molécula objetivo), de tal forma que en ausencia de eventos de enlace no específico, la sonda secundaria no hibridará con el objetivo.

Cuando se usa un sistema de detección basado en hibridación, se elige una sonda de ácidos nucleicos que es complementaria a una secuencia de ácidos nucleicos objetivo, y después por la selección de las condiciones apropiadas la sonda y la secuencia objetivo "hibridan selectivamente", o enlazan, entre sí para formar una molécula híbrida. Una molécula de ácidos nucleico que es capaz de hibridar selectivamente con una secuencia objetivo bajo "rigurosidad moderada" hibrida típicamente bajo condiciones que permiten la detección de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo de al menos alrededor de 10-14 nucleótidos de longitud que tiene aproximadamente un 70% de identidad de secuencia con la secuencia de la sonda de ácidos nucleicos seleccionada. Las condiciones de hibridación rigurosas permiten típicamente la detección de secuencias de ácidos nucleicos objetivo de al menos alrededor de 10-14 nucleótidos de longitud que tienen una identidad de secuencia de más de alrededor del 90-95% con la secuencia de la sonda de ácidos nucleicos seleccionada. Las condiciones de hibridación útiles para la hibridación de la sonda/objetivo cuando la sonda y el objetivo tienen un grado específico de identidad de secuencia, se pueden determinar como se conoce en la técnica (ver, por ejemplo Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, editors B.D. Hames and S.J. Higgins, (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Press).

Con respecto a las condiciones de rigurosidad para la hibridación, es bien conocido en la técnica que se pueden emplear numerosas condiciones equivalentes para establecer una rigurosidad particular variando, por ejemplo, los siguientes factores: la longitud y naturaleza de las secuencias de la sonda y el objetivo, la composición base de las varias secuencias, las concentraciones de sales y otros componentes de la solución de hibridación, la presencia o ausencia de agentes bloqueantes en las soluciones de hibridación (por ejemplo, formamida, sulfato de dextrano y polietilenglicol), temperatura de la reacción de hibridación y parámetros temporales, así como, variando las condiciones de lavado. La selección de un conjunto particular de condiciones de hibridación se selecciona siguiendo métodos estándar en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.).

El término "estructura secundaria" se refiere a la conformación (estructura secundaria o terciaria) de un polinucleótido. Por ejemplo, las moléculas de ARN monocatenarias adoptan comúnmente estructura secundaria como horquillas, estructura de raíz y bucle y similares. La estructura secundaria de cualquiera nucleótido dado se puede predecir de la secuencia primaria usando un número de algoritmos, por ejemplo el paquete *mfold* para la predicción de la estructura secundaria de ADN y ARN como se describe en Zucker et al. "Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: a practical guide," disponible en internet.

El término "derivado de" se usa para identificar la fuente alfaviral de la molécula (por ejemplo, polinucleótido, polipéptido). Un primer polinucleótido está "derivado de" un segundo polinucleótido si tiene la misma o sustancialmente la misma secuencia de pares de base que una región del segundo polinucleótido, su ADNc, complementos del mismo, o si muestra identidad de secuencia como se ha descrito anteriormente o si codifica un polipéptido que es el mismo o sustancialmente el mismo que un polipéptido codificado por el segundo polinucleótido. Así, un polinucleótido está "derivado de" un alfavirus particular (por ejemplo, especie) si tiene (i) la misma o sustancialmente la misma secuencia que al menos una porción de la secuencia de alfavirus particular o (ii) codifica un polipéptido que muestra identidad de secuencia (por ejemplo mayor del 50% de porcentaje de identidad como se ha descrito anteriormente) con cualquiera de los polipéptidos de ese alfavirus como se ha descrito anteriormente. Así, las secuencias descritas en la presente pueden estar derivadas de uno o más alfavirus (SIN, VEE, SFV, etc.) que pueden ser fácilmente obtenidos dada la divulgación proporcionada en la presente de fuentes de origen natural, o de depositarios (por ejemplo, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland). Ejemplos representativos de alfavirus adecuados se describen con más detalle en la Patente U.S: N° 5.843.723 y la Publicación de PCT N° WO97/38087.

Los "elementos de control" típicos incluyen, pero no están limitados a, promotores de la transcripción, elementos potenciadores de la transcripción, señales de terminación de la transcripción, secuencias de poliadenilación (localizadas 3' del codón de parada de la translación), secuencias para la optimización del inicio de la translación (localizadas 5' a la secuencia de codificación), secuencias de terminación de la translación, secuencia 5' requerida para la amplificación mediada por proteínas no estructurales, secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteínas no estructurales y medios para expresar una o más secuencias heterólogas (por ejemplo, promotor de la región de unión subgenómica), ver por ejemplo, McCaughan et al. (1995) PNAS USA 92:5431-5435; Kochetov et al (1998) FEBS Letts. 440:351-355.

"Sistema de Iniciación del Vector estratificado Eucariota" se refiere a un polinucleótido que comprende un ensamblaje que es capaz de dirigir la expresión de una secuencia o gen de interés. El sistema de iniciación del vector estratificado eucariota debería contener un promotor 5' que es capaz de iniciar in vivo (es decir dentro de la célula eucariota) la síntesis del ARN del ADNc, y una secuencia de vector de ácidos nucleicos (por ejemplo, vector viral) que es capaz de dirigir su propia replicación en una célula eucariota y también expresar una secuencia heteróloga. Preferiblemente, la secuencia del vector de ácidos nucleicos es una secuencia derivada de alfavirus y está comprendida de secuencias celulares o virales 5' requeridas para la amplificación mediada por proteínas no estructurales (también referida como 5' CSE, o secuencia de replicación en cis 5', o secuencias virales 5' requeridas en cis para la replicación, o secuencia 5' que es capaz de iniciar la transcripción de un alfavirus), así como secuencias que, cuando se expresan codifican para proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas (por ejemplo, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4), y secuencias celulares o virales 3' requeridas para la amplificación mediada por proteínas no estructurales (también referida como 3' CSE, o secuencias virales 3' requeridas en cis para la replicación, o una secuencia de reconocimiento de polimerasa de ARN de alfavirus). Además, la secuencia del vector puede incluir un medio para expresar secuencias heterólogas, como por ejemplo, un promotor subgenómico viral (por ejemplo, alfaviral) (por ejemplo promotor de la región de unión) que puede, en ciertas realizaciones, ser modificado para evitar, aumentar o reducir la transcripción viral del fragmento subgenómico, o para disminuir la homología con auxiliares o casetes de expresión de proteínas estructurales defectuosos y una o más secuencias heterólogas a ser expresadas. Preferiblemente la secuencia heteróloga comprende una gen que codifica a la proteína y dicho gen es el gen 3' proximal dentro de la secuencia del vector. El sistema de iniciación del vector estratificado eucariota puede también contener una secuencia de poliadenilación, secuencias de reconocimiento de empalme, una secuencia de procesamiento de ribozoma catalítico, una señal de exportación nuclear, y una secuencia de terminación de la transcripción. Preferiblemente, el sistema de iniciación del vector estratificado eucariota contiene secuencias que codifican todas las proteínas estructurales del alfavirus (cápside, E2 y E1). Un ELVIS "híbrido" se refiere a un ensamblaje que incluye secuencias de polinucleótidos derivadas de dos o más

alfavirus.

Como se analiza con más detalle a continuación, la presente invención incluye, pero no está limitada a, secuencias adecuadas para su uso en constructos de alfavirus; constructos que comprenden estas secuencias; líneas celulares de encapsidación; métodos de encapsidar partículas de alfavirus recombinantes; métodos de eliminar la co-encapsidación durante la encapsidación de vectores.

DESCRIPCION GENERAL

La presente invención se refiere a secuencias de amplificación 5' para su uso en la generación de partículas basadas en alfavirus, secuencias particulares que han sido diseñadas para su uso en casetes de expresión de proteínas estructurales. Las secuencias de amplificación 5' descritas en la presente reducen eventos de co-encapsidación durante la generación de partículas de replicones de alfavirus y, por lo tanto, encuentran uso en la encapsidación de líneas celulares, y métodos de generar partículas de replicones de alfavirus.

Actualmente, las partículas de replicones de alfavirus son generadas típicamente usando un sistema multi-constructo que separa los varios elementos requeridos para la formación de partículas. La separación de estos elementos en diferentes constructos reduce el riesgo de generar virus infecciosos de tipo salvaje. Los sistemas incluyen típicamente un vector de replicón, que contiene elementos necesarios para su propia replicación intracelular (por ejemplo secuencias de codificación de proteínas no estructurales) pero carece de los elementos necesarios para la producción de partículas de progenie (por ejemplo secuencias de codificación de proteínas estructurales) y uno o más casetes de expresión de proteínas estructurales (por ejemplo constructos auxiliares defectuosos) que codifican las proteínas estructurales (por ejemplo, cápside, glicoproteínas) requeridas para la encapsidación. Los constructos de replicones y los constructos auxiliares defectuosos pueden basarse en ADN y/o ARN. Ver, por ejemplo, Polo et al. (1999) Proc. Nat'l Acad. Sci USA 96:4598-4603; Patentes U.S: N° 6.465.634; 6.426.196; 6.376.236; 6.342.372; 6.015.686 y 5.843.723.

Como se representa en la Figura 1, se pueden usar dos constructos auxiliares defectuosos para proporcionar los genes estructurales para la encapsidación del ARN del replicón. Se puede preferir el uso de dos auxiliares defectuosos separado, ya que se reduce el riesgo de generar virus competentes en replicación (RCV). Ver, por ejemplo, Patente U.S. N° 6.426.196. Los constructos auxiliares contienen elementos en cis necesarios para su propia amplificación por los no estructurales producidos en trans y para la expresión de los genes de proteínas estructurales, pero carecen de proteínas no estructurales de alfavirus. Para reducir la co-encapsidación de auxiliares en las partículas de replicones, la señal de encapsidación del alfavirus que actúa en cis es también típicamente eliminada de los constructos auxiliares. La co-encapsidación se refiere a tanto la generación de partículas que contienen uno o más ARNs auxiliares pero no constructos de ARN de replicones (también referidos como partículas "abortivas") así como a la generación de partículas que contienen una o más secuencias auxiliares además de las secuencias de replicones. Ambas formas de co-encapsidación no son deseables. En particular, la presencia de partículas abortivas puede interferir con la infectividad de las partículas de replicones, reduciendo eficazmente la eficiencia de la infección de las partículas. De manera similar, la co-encapsidación de secuencias de replicones y auxiliares puede resultar en la producción de nuevas partículas en el momento de la infección de células nativas y estas partículas se pueden comportar más como virus competentes en replicación (RCV), incluyendo efectos no deseables de los virus.

Se pueden incorporar varios elementos en cis implicados en la replicación (es decir secuencias de amplificación 5') en constructos auxiliares defectuosos incluyendo, por ejemplo, secuencias 5' de alfavirus nativas (tipo salvaje) de virus homólogos, secuencias 5' de alfavirus nativas de virus heterólogos, secuencias 5' de alfavirus interferentes defectuosas (DI) no nativas de virus homólogos, secuencias 5' de alfavirus DI no nativas de virus heterólogos, secuencia viral derivada de no alfavirus (por ejemplo, togavirus, virus vegetales) y secuencias derivadas de ARN celular (por ejemplo, elemento ARNt) (por ejemplo Monroe et al., PNAS 80:3279-3283, 1983; Niesters et al., J. Virol. 64:4162-4168, 1990; Niesters et al., J. Virol. 64:1639-1647, 1990; Tsiang et al. (1988) J Virol. 62(1):47-53).

Aunque estas secuencias de amplificación 5' pueden servir para mediar la replicación, cada una de las secuencias de amplificación 5', incluyendo las secuencias derivadas no de alfavirus como secuencias ARN_{asp}, pueden también mostrar efectos de co-encapsidación no deseables. Ver, por ejemplo, Bredenbeek et al. (1993) J. Virol 67:6439-6446; Tsaing et al. (1985) J. Virol. 54:38-44.

Se describen en la presente composiciones y métodos para reducir o eliminar la encapsidación de secuencias no deseadas en partículas de replicones de alfavirus, mientras que al mismo tiempo, se permite la replicación eficiente de los vectores de alfavirus. A este respecto, los inventores han descubierto que las secuencias usadas típicamente como señales de replicación para los casetes de proteínas estructurales de alfavirus que se usan en la encapsidación de partículas de replicones de alfavirus a menudo contienen secuencias que pueden servir indeseablemente como señales de encapsidación. Específicamente, parece que la estructura (secuencia) primaria de la secuencia de amplificación 5' juega un papel en la co-encapsidación no deseada pero no en las funciones de replicación (amplificación) deseables que son mayoritariamente dependientes de la estructura secundaria de la

misma región. (Figura 4A y 4B). Diseñando una molécula que mantiene una estructura secundaria que es característica de las secuencias de amplificación funcionales, pero elimina la homología de la secuencia primaria a señales de encapsidación conocidas, la presente invención permite nuevas composiciones y métodos que cumplen eficazmente y eficientemente la replicación de los constructos auxiliares de proteínas estructurales necesarias para la encapsidación de alfavirus y reducen o eliminan la co-encapsidación de los constructos auxiliares. Además, los constructos auxiliares que comprenden las secuencias de amplificación 5' modificadas descritas en la presente producen partículas de replicones con mayor infectividad que las producidas con constructos auxiliares que incluyen secuencias que contienen ARNt. (Figura 6).

10 SECUENCIAS DE AMPLIFICACION 5' MODIFICADAS

Las secuencias de amplificación 5' modificadas descritas en la presente son secuencias que son secuencias de amplificación funcionales pero esencialmente incapaces de servir como señales de encapsidación. Así, la secuencia particular de las secuencias de amplificación 5' modificadas descritas en la presente puede variar enormemente, mientras que son esencialmente incapaces de servir como señales de encapsidación y funcionales como señales de amplificación (replicación).

Las secuencias de amplificación 5' modificadas descritas en la presente son de entre 10 y 150 nucleótidos de longitud (o cualquier longitud entre ellos), más preferiblemente de entre alrededor de 30 y 100 nucleótidos de longitud (o cualquier longitud entre ellos), e incluso más preferiblemente de entre alrededor de 40 y 80 nucleótidos de longitud (o cualquier longitud entre ellos).

En general, la producción de secuencias 5' modificadas implica tanto la secuencia como el análisis estructural de un polinucleótido. Típicamente, el proceso comienza comparando la secuencia primaria de una secuencia de amplificación 5' conocida (por ejemplo ARN_tasp) con señales de encapsidación conocidas. Las secuencias de amplificación 5' que actúan en cis descritas en la presente pueden estar derivadas de cualquier número de fuentes, por ejemplo, de secuencias 5' de alfavirus nativas de cualquier virus, extremos 5' de alfavirus nativos de virus heterólogos, extremos 5' de alfavirus DI no nativos de virus homólogos, extremos 5' de alfavirus DI no nativos de virus heterólogos, secuencia viral derivada no de alfavirus (por ejemplo togavirus, virus vegetal) y secuencia derivada de ARN celular (por ejemplo elemento de ARN_t) (por ejemplo, Monroe et al., PNAS 80:3279-3283, 1983; Niesters et al., J. Virol. 64:4162-4168, 1990; Niesters et al., J. Virol. 64:1639-1647, 1990). Las secuencias de estas y otras secuencias de amplificación 5' funcionales y señales de encapsidación se conocen a disposición del público en cualquier número de bases de datos.

Así, el proceso de obtener una secuencia de amplificación 5' modificada con una estructura secundaria predeterminada puede empezar por el análisis de secuencias de amplificación 5' conocidas. Las secuencias dentro de las secuencias de amplificación 5' que funcionan como señales de amplificación pueden ser identificadas por cualquier medio adecuado, por ejemplo, por alineamiento con señales de encapsidación conocidas para determinar las regiones de homología alta. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 2, los nucleótidos 37 a 58 de la secuencia de ARN_t-asp conocida (Monroe et al. (1983) Proc. Nat'l Acad. Sci USA 80:3279-3282) muestra homología significativa (>80%) con los nucleótidos 1029-1050 de Sindbis (SIN) (Nº de Acceso de GenBank NC001547, Strauss et al. (1984) Virol 133:92-110), cuyos nucleótidos se sabe que están implicados en la encapsidación. Se debe entender que el SIN del tipo salvaje se usa solamente para propósitos de ejemplificación de la invención y que cualquier secuencia de la señal de encapsidación se puede elegir para la comparación.

Una vez identificadas, las señales de encapsidación pueden hacerse defectuosas por cualquier medio adecuado, por ejemplo alterando la secuencia primaria de la señal de amplificación 5' para disminuir la homología con señales de encapsidación conocidas. (Ejemplo 1). Las secuencias se pueden alterar por mutagénesis, sustitución, inserción y/o delección de uno o más nucleótidos de tal forma que la secuencia primaria no funcione como una señal de encapsidación.

El grado de homología a niveles de secuencia primaria entre secuencias modificadas y no modificadas puede variar enormemente, siempre que la señal de encapsidación sea defectuosa. Por ejemplo, en las regiones identificadas como señales de encapsidación putativas, la homología, al nivel de secuencia primaria, entre secuencias modificadas y no modificadas puede ser tanto como el 99%, aunque está preferiblemente entre alrededor del 90% y el 99% o entre alrededor del 90% y alrededor del 95%, más preferiblemente menos del 90%, más preferiblemente menos del 80% e incluso más preferiblemente menos del 70% de homología con las regiones de la misma longitud de una señal de encapsidación conocida. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 3, las secuencias de amplificación 5' modificadas ejemplares (SEQ ID NOs: 4-16) se generaron modificando la región de ARN_t-aso que mostró homología con la señal de encapsidación SIN del tipo salvaje, de tal forma que la homología en esta región se reduce enormemente (por ejemplo, de más del 80% a menos del 70% en todos los casos y menos del 40% en algunos casos (por ejemplo, SEQ ID NOs: 4, 11, 14 y 15)). Aunque las secuencias en la Figura 3 se muestran como secuencias de ADN, será aparente que para su uso en vectores basados en ARN las secuencias se reemplazan por los residuos de ARN correspondientes, es decir, T se reemplaza por U.

Las modificaciones a la secuencia primaria se hacen preferiblemente de tal forma que la estructura secundaria del polinucleótido permanece sustancialmente similar a la de la secuencia de amplificación 5' no modificada. Como se ha señalado anteriormente, las moléculas de ácidos nucleicos monocatenarias (por ejemplo, ARN) adoptan comúnmente estructura secundaria como horquillas, estructura de raíz y bucle y similares. Las técnicas para predecir la estructura secundaria de cualquier secuencia de ácidos nucleicos dada están disponibles fácilmente y descritas, por ejemplo en Zucker et al. "Algorithms and Thermodynamics for RNA secondary structure prediction: a practical guide" and Macke et al. (2001) *Nucleic Acids Res* 29(22):4724-4735.

Así se introducen mutaciones en secuencias de señal de encapsidación putativas para generar secuencias que tienen una secuencia primaria diferente pero que tienen una secuencia secundaria de secuencias de amplificación 5' conocidas (por ejemplo, estructura secundaria de ARNTasp como se muestra en la Figura 4A).

Alternativamente, las secuencias de amplificación 5' modificadas descritas en la presente pueden ser secuencias sintéticas generadas para tener una estructura secundaria similar a secuencias de amplificación conocidas.

Por lo tanto, aunque las secuencias de amplificación 5' modificadas divulgadas en la presente forman estructuras secundarias características de secuencias de amplificación 5' que actúan en cis, son defectuosas como señales de encapsidación, presumiblemente debido a la homología disminuida con señales de encapsidación conocidas a nivel de estructura primaria.

En ciertas realizaciones, las secuencias de amplificación 5' modificadas, como se divulgan en la presente, contienen modificaciones adicionales en regiones fuera de la señal de encapsidación. Las secuencias de amplificación 5' modificadas descritas en la presente pueden ser usadas en la producción de constructos auxiliares defectuosos, líneas celulares de encapsidación y similares.

COMPONENTES ADICIONALES DE CASETES DE PROTEINAS ESTRUCTURALES (por ejemplo, CONSTRUCTOS AUXILIARES)

En ciertos aspectos, las secuencias de amplificación 5' modificadas descritas en la presente forman parte de un casete de proteínas estructurales o constructo auxiliar defectuosos. Así, además de las secuencias de amplificación 5' modificadas, los constructos auxiliares, descritos en la presente incluirán típicamente una variedad de secuencias de ácidos nucleicos, tanto de secuencias codificantes como de no codificantes. Será aparente que las composiciones descritas en la presente comprenderán generalmente menos de un genoma de alfavirus completo (por ejemplo, contienen menos de todas las secuencias codificantes y/o no codificantes contenidas en un genoma de un alfavirus) en un único polinucleótido.

Los constructos auxiliares que comprenden una secuencia de amplificación 5' modificada como se describe en la presente incluirán también típicamente una o más secuencias que codifican para varios polipéptidos de alfavirus, por ejemplo uno o más polipéptidos de alfavirus estructurales (por ejemplo, cápside, glicoproteína de la envoltura). Las proteínas estructurales que rodean (y en algunos casos, interactúan con) los componentes de los polinucleótidos del vector o replicón de alfavirus incluyen glicoproteínas de tanto la envoltura como la cápside. Ver por ejemplo, Strauss et al. (1994) *Microbiol. Rev.*, 58:491-562. En la mayoría de las situaciones, los componentes de los polinucleótidos están rodeados por las proteínas de la cápside, que forman nucleocápsides. A su vez, la proteína de la nucleocápside está rodeada por una envoltura lipídica que contiene las proteínas de la envoltura. La proteína de la cápside es la proteína N-terminal de la poliproteína estructural de alfavirus, y después del procesamiento de la poliproteína, interactúa con el ARN de alfavirus que contiene la señal de encapsidación y otros monómeros de proteínas de la cápside para formar estructuras de la nucleocápside. Las glicoproteínas de la envoltura de alfavirus (por ejemplo, E2, E1) sobresalen de la partícula envuelta como "espículas" de superficie, que están implicadas funcionalmente en el enlace del receptor y la entrada en la célula objetivo.

Las secuencias adicionales pueden ser codificantes o no codificantes. Ejemplos no limitativos de secuencias no codificantes incluyen un medio para expresar un gen 3' proximal (elementos de control como promotores y similares, por ejemplo, un promotor subgenómico de alfavirus nativo de virus homólogo, un promotor subgenómico de alfavirus nativo de virus heterólogo, un promotor subgenómico de alfavirus de núcleo (homólogo o heterólogo), secuencias mínimas hacia arriba o hacia abajo de promotor subgenómico de núcleo, mutaciones/delecciones/adiciones de promotor subgenómico nativo o de núcleo, un promotor subgenómico compatible derivado no de alfavirus (por ejemplo, virus vegetal), un sitio de entrada del ribosoma interno (IRES), y/o un elemento de translectura ribosómico (por ejemplo, BiP); región no traducida del extremo 5' de ARNm subgenómico (5' NTR subgenómico), una o más secuencias 5' o 3' adicionales requeridas para la amplificación mediada por proteínas no estructurales (Patentes U.S. 5.843.723; 6.015.694; 5.814.482; Publicaciones de PCT WO97/38087; WO00/61772), un gen 3' proximal (por ejemplo, una secuencia heteróloga, secuencia que codifica al polipéptido). Ver también, Kuhn et al. (1990) *J. Virol.* 64:1465-1476); y/o una secuencia de poliadenilación (por ejemplo dentro de las secuencias 3'), ver por ejemplo, George et al. (2000) *J. Virol.* 74:9776-9785).

Las secuencias codificantes y no codificantes usadas en los constructos auxiliares descritas en la presente pueden incluir secuencias derivadas de uno o más alfavirus y/o fuentes no-alfavirales (por ejemplo, alfavirus, togavirus, virus vegetal). Generalmente, aunque la numeración de los nucleótidos y aminoácidos es algo diferente entre alfavirus, principalmente debido a ligeras diferencias en longitudes de poliproteínas, los alineamientos entre secuencias de diferentes alfavirus proporciona un medio para identificar regiones similares en otros alfavirus (ver alineamiento representativo en Kinney et al. (1989) Virology 170:19-30 y Strauss et al. (1984) Virology 133:92-110 para un genoma SIN del tipo salvaje ejemplar de 11.703 nucleótidos de longitud, al que se le puede alinear cualquier otro genoma de alfavirus). En ciertas realizaciones, los constructos auxiliares incluyen secuencias derivadas de dos o más miembros del género alfavirus. Ciertas de las secuencias de alfavirus descritas en la presente se describen con más detalle en la Solicitud Internacional en co-propiedad WO 02/099035.

Además, una o más de las secuencias de constructos auxiliares pueden incluir una o más modificaciones en comparación con el tipo salvaje. Las modificaciones a secuencias de codificación de alfavirus pueden incluir, pero no están limitadas a, mutaciones, deleciones, adiciones o sustituciones de secuencias de nucleótidos, en todo o en parte, como por ejemplo, proteína no estructural híbrida que comprende secuencias de uno o más alfavirus y/o otro virus (por ejemplo, alfavirus, otro togavirus, virus vegetal).

LINEAS CELULARES DE ENCAPSIDACIÓN DE ALFAVIRUS

En realizaciones adicionales de la invención, se proporcionan líneas celulares de encapsidación de alfavirus. En particular dentro de un aspecto de la presente invención, se proporcionan líneas celulares de encapsidación de alfavirus donde las proteínas estructurales alfavirales, suministradas en trans de uno o más vectores de expresión que llevan una o más secuencias de amplificación 5' modificadas como se define en las reivindicaciones que están preferiblemente integradas establemente, son capaces de encapsidar transcritos de ARN del vector transfectado, transducido o producido intracelularmente en el citoplasma y liberar las partículas del vector de replicón encapsidado infecciosas a través de la membrana celular, creando de esta manera una línea celular productora (de encapsidación) de vectores de alfavirus (PCL).

Por ejemplo, se proporcionan líneas celulares de encapsidación de alfavirus en donde las proteínas estructurales virales se suministran en trans desde uno o más vectores de expresión transformados establemente (casetes de expresión de proteínas estructurales) como se describe en la presente (por ejemplo, incluyendo una secuencia de amplificación 5'), y son capaces de encapsidar transcritos de ARN del vector transfectado, transducido o producido intracelularmente en el citoplasma y liberar las partículas del vector de replicón encapsidado infecciosas a través de la membrana celular. En ciertas realizaciones, las proteínas estructurales necesarias para la encapsidación son sintetizadas a altos niveles solo después de la inducción por el mismo replicón del vector de ARN o algún otro estímulo proporcionado, y los transcritos que codifican estas proteínas estructurales son capaces de amplificación citoplásmica de una manera que permitirá niveles de expresión suficientes para imitar la de una infección viral natural. Además, en otras realizaciones, la expresión de un marcador seleccionable está ligada operativamente al casete de expresión de proteínas estructurales. Dicho marcador seleccionable permite la generación eficiente de PCL transformado establemente, funcional.

Por ejemplo, las moléculas de replicones de vectores de ARN de alfavirus del fenotipo deseado a ser encapsidado, que son ellas mismas capaces de replicación autocatalítica (por ejemplo, el replicón contiene todos los elementos (cis y trans) necesarios para la replicación en las células permisivas) en el citoplasma celular, pueden ser introducidas en las células de encapsidación como ARN transcrito in vitro, partículas de alfavirus recombinantes, o como constructos de vectores de ADNc de alfavirus. Las moléculas de replicones de vectores de ARN de alfavirus replican entonces a niveles altos, estimulan la amplificación de los transcritos de genes de proteínas estructurales y la posterior expresión de proteínas estructurales y son encapsidadas posteriormente por las proteínas estructurales virales, produciendo partículas de vectores infecciosas. La expresión intracelular de proteínas de alfavirus y/o ARN del vector sobre ciertos niveles puede resultar en efectos citotóxicos en las líneas celulares de encapsidación o productoras. Por lo tanto, en ciertas realizaciones de la invención, puede ser deseable para estos elementos ser derivados de variantes de virus seleccionadas para citotoxicidad reducida de sus proteínas estructurales expresadas, inhibición reducida de la síntesis macromolecular huésped, y/o la capacidad para establecer infección persistente.

Para optimizar el rendimiento de la línea celular de encapsidación del vector y el título del vector final, se pueden realizar ciclos sucesivos de transferencia de genes y encapsidación de vectores, como se describe con detalle en la Patente U.S. Nº 6.391.632. De manera similar, se pueden producir PLCs usando vector de expresión de ADN integrado estable o mantenido episomalmente, como se describe con detalle en la Patente U.S. Nº 6.391.632.

Las moléculas de vectores de ARN de alfavirus, capaces de replicar en el citoplasma de la célula de encapsidación, pueden ser producidas inicialmente utilizando, por ejemplo, un sistema de polimerasa de ARN SP6 para transcribir in vitro un clon de vector de ADNc que codifica el gen de interés dentro de un vector de replicón de alfavirus que contiene proteínas no estructurales funcionales. Los transcritos del ARN del vector son entonces

transfectados en la línea celular de encapsidación del alfavirus, de tal forma que el ARN del vector replica a niveles altos, y es posteriormente encapsidado por las proteínas estructurales virales, produciendo partículas de vectores de replicones infecciosas.

5 En otras realizaciones, las PLCs pueden ser producidas usando partículas de vectores de alfavirus pseudotipificadas, como se describe en la Patente U.S. N° 5.789.245. La Patente U.S. N° 5.789.245 también describe modificaciones adicionales que se pueden hacer a PLCs, por ejemplo modificaciones por las que las proteínas estructurales necesarias para la encapsidación se sintetizan sólo después de la inducción por el mismo vector de ARN o algún otro estímulo.

10 En la práctica de la presente invención se puede usar una variedad de células diferentes conocidas en la técnica; por ejemplo, células mamíferas, células de aves, baculovirus, bacterias y células de levadura. Los sistemas de expresión de células de insectos, como los sistemas de baculovirus son conocidos por los expertos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987).
15 Los materiales y métodos para los sistemas de expresión de baculovirus/células de insectos están disponibles comercialmente en forma de kit de, entre otros, Invitrogen, San Diego CA. Los sistemas de expresión de células de aves también son conocidos por los expertos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Patentes U.S. N° 5.340.740; 5.656.479; 5.830.510; 6.114.168; y 6.500.668; Patente europea EP 0787180B; Solicitud de Patente Europea N° EP03291813.8; WO 03/043415; y WO 03/076601. De manera similar, los sistemas de expresión celular bacterianos y mamíferos también son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Yeast Genetic Engineering (Barr et al., eds., 1989) Butterworths, Londres.

20 También se conocen un número de células huésped apropiadas para su uso con los sistemas anteriores. Por ejemplo, se conocen en la técnica líneas celulares mamíferas e incluyen líneas celulares inmortalizadas disponibles de American Type Culture Collection (ATCC), como, pero no limitado a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLA, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (por ejemplo, Hep G2), células de riñón bovinas Madin-Darby ("MDBK"), así como otras. Las fuentes mamíferas de células incluyen, pero no están limitadas a, células de primate humanas o no humanas (por ejemplo PERC. 6) que se describen en por ejemplo la WI 01/38362 y WO 02/40665, incorporadas por referencia en la presente en su totalidad, así como depositadas bajo el número de depósito ECACC 96022940), MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75),
30 células pulmonares rhesus fetales (ATCC CL-160), células de riñón embrionario humano (células 293, transformadas típicamente por ADN tipo 5 de adenovirus fragmentado), células VERO de riñones de mono), caballo, vaca (por ejemplo células MDBK), oveja, perro (por ejemplo células MDCK de riñones de perro, ATCC CCL34 MDCK (NBL2) o MDCK 33016, número de depósito DSM ACC 2219 como se describe en la WO 97/37001), gato, y roedor (por ejemplo, células de hámster como HK21-F, células HKCC, o células de ovario de hámster chino (células CHO)),
35 y se pueden obtener de una amplia variedad de estados de desarrollo incluyendo, por ejemplo, adulto, neonatal, fetal, y embrión.

40 Las fuentes de aves de células incluyen, pero no están limitadas a, células de pollo (por ejemplo, células madre embrionarias de pollo (por ejemplo, células EBx®), fibroblastos embrionarios de pollo, células germinales embrionarias de pollo)). De manera similar, los huéspedes bacterianos como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, y *Streptococcus spp.*, encontrarán uso con los constructos de la presente invención. Los huéspedes de levadura útiles en la presente invención incluyen, entre otros, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Las células de insecto para su uso con vectores de expresión de baculovirus incluyen, entre otros, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, y *Trichoplusia ni*.

50 METODOS DE ENCAPSIDACION DE PARTICULAS DE ALFAVIRUS RECOMBINANTES

Como se proporciona por la invención, la generación (encapsidación) de partículas de vectores de alfavirus recombinantes (partículas de replicones) se puede conseguir fácilmente por, por ejemplo, la co-transfección de vectores de replicones con casetes de expresión de proteínas estructurales, vectores complementarios y moléculas auxiliares defectuosas (DH) derivadas de ARN transcrito in vitro, ADN plásmido, o por la co-infección con virus (ver Bredenbeek et al., J. Virol. 67:6439-6446, 1993, Dubensky et al., J. Virol 70:508-519, 1996 y Patentes U.S.: N° 5.814.482, 5.739.026, 5.766.602, 5.789.245 y 5.792.462. Las composiciones y métodos para la encapsidación de vectores de alfavirus también se describen en las Patentes U.S.: N° 6.329.201 y 6.242.259.

60 Alternativamente, las partículas de vectores pueden ser generadas por la introducción del ARN del vector en las líneas celulares de encapsidación de alfavirus estables descritas anteriormente. Brevemente, tales PCL y sus casetes de expresión de proteínas estructurales transformados pueden ser derivados usando métodos esencialmente como se describen en la Patente U.S. N° 5.789.245, particularmente usando constructos que comprenden secuencias de amplificación 5' modificadas como se describe en la presente. Por ejemplo, la producción de partículas de vectores de alfavirus recombinantes por PCL puede conseguirse después de la introducción de moléculas de vectores basadas en alfavirus en la PCL, los vectores estando derivados de ARN

transcrito in vivo, ADN plásmido, o partículas de alfavirus recombinantes previamente obtenidas, incubando la PCL bajo condiciones y para un tiempo necesario para la encapsidación de las partículas de vectores, y recolectando las partículas de vectores encapsidadas. Como se muestra en los ejemplos detallados proporcionados en la presente, la utilización de las nuevas secuencias de amplificación 5' de la presente invención para la encapsidación de los vectores eficiente en dichos enfoques se consigue fácilmente.

La co-encapsidación podría ser evaluada por el paso en serie de partículas de replicones en células cultivadas nativas (por ejemplo, células que no son células de encapsidación). Las partículas de replicones sin co-encapsidación no producirán nuevas partículas de replicones de la progenie después de infectar las células nativas, mientras que la partículas de replicones con co-encapsidación producirá continuamente nuevas partículas de replicones. También bajo el microscopio, la co-encapsidación que contiene replicones puede producir patrones similares a focos de efecto citopático (CPE), resultando del esparcimiento de partículas directo de células adyacentes. La co-encapsidación también puede ser determinada por la infección de células nativas con partículas de replicones y probando la expresión de una o más proteínas estructurales de alfavirus en las células infectadas (por ejemplo, por western blot).

SECUENCIAS HETEROLOGAS

Como se ha señalado anteriormente, las secuencias de amplificación 5' modificadas (y constructos que comprenden estas secuencias) descritas en la presente se pueden usar en una amplia gama de aplicaciones. Por ejemplo, las secuencias de amplificación 5' modificadas se pueden usar en constructos auxiliares para producir partículas de replicones de alfavirus. Las partículas de replicones pueden incluir una amplia variedad de secuencias heterólogas, por ejemplo, secuencias que codifican paliativos como linfoquinas o citoquinas, toxinas, y enzimas convertidores de profármacos, secuencias que codifican antígenos que estimulan una respuesta inmune, ribozimas o secuencias antisentido, secuencias que codifican proteínas para aplicación terapéutica como factores de crecimiento o regulatorios, y secuencias que codifican proteínas que asisten o inhiben una respuesta inmune.

Preferiblemente, las secuencias de nucleótidos deberían ser de un tamaño suficiente para permitir la producción eficiente de partículas de vectores viables. Dentro del contexto de la presente invención, la producción de cualquier título medible de partículas de alfavirus recombinantes, por ejemplo, por transferencia del ensayo de expresión, ensayo de la línea celular de titulación, ensayo de indicador o ensayo de placas en monocapas susceptibles apropiadas, se considera "producción de partículas de vectores viables". Esto puede ser, en un mínimo, un constructo de vector de alfavirus que no contiene ninguna secuencia heteróloga adicional. Sin embargo, en otras realizaciones, el constructo del vector puede contener secuencias heterólogas o extrañas adicionales. En las realizaciones preferidas, la secuencia heteróloga puede comprender una secuencia heteróloga de al menos alrededor de 100 bases, 2 kb, 3,5 kb, 5 kb, 7 kb o incluso una secuencia heteróloga de al menos alrededor de 8 kb. Las secuencias heterólogas anteriormente descritas pueden obtenerse fácilmente de una variedad de fuentes, incluyendo por ejemplo, depositarios como la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md.), o de fuentes comerciales como British Bio-Technology Limited (Cowley, Oxford, Inglaterra). Alternativamente, las secuencias de ADNc que codifican las secuencias heterólogas anteriormente descritas pueden obtenerse de células que expresan o contienen las secuencias, utilizando procedimientos estándar conocidos en la técnica. Además, las secuencias heterólogas también se pueden sintetizar, por ejemplo en un sintetizador de ADN de Applied Biosystems, Inc.

Ejemplos representativos de secuencias heterólogas adecuadas se analizan con más detalle en la Patente U.S: N° 5.843.723.

Ejemplos no limitativos de secuencias heterólogas que codifican proteínas inmunogénicas incluyen proteínas derivadas de una o más de las siguientes expuestas a continuación:

Antígenos bacterianos como *N. meningitides*: un antígeno de proteína del serogrupo A, C, W135, Y, y/o B (1-7) de *N. meningitides*; una preparación de vesícula de la membrana externa (OMV) del serogrupo B de *N. meningitides*. (8, 9, 10, 11); un antígeno sacárido, incluyendo LPS, del serogrupo A, B, C, W135 y/o Y de *N. meningitides*, como el oligosacárido del serogrupo C (ver PCT/US99/09346; PCT IB98/01665; y PCT IB99/00103); *Streptococcus pneumoniae*: un antígeno sacárido o de proteína, particularmente un sacárido de *Streptococcus pneumoniae*; *Streptococcus agalactiae*: particularmente, antígenos del estreptococo del Grupo B; *Streptococcus pyogenes*: particularmente, antígenos del estreptococo del Grupo A; *Enterococcus faecalis* o *Enterococcus faecium* (particularmente una repetición trisacárida u otros antígenos derivados de *Enterococcus* proporcionados en la Patente U.S. N° 6.756.361); *Helicobacter pylori*: incluyendo: Cag, Vac, Nap, HopX, HopY y/o antígeno de ureasa; *Bordetella pertussis*: como holotoxina de tosferina (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis*, opcionalmente también la combinación con pertactina y antígeno de aglutinógenos 2 y 3; *Staphylococcus aureus*: incluyendo polisacáridos capsulares tipo 5 y 8 de *S. aureus* conjugados opcionalmente con exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* recombinante no tóxica, como StaphVAX™, o antígenos derivados de proteínas de superficie, invasinas (leucocidina, quinasas, hialuronidasa), factores que inhiben la superficie inmersión fagocítica (cápsula, Proteína A), carotenoides, producción de catalasa, proteína A, coagulasa, factores de coagulación, y/o toxinas que dañan la membrana (opcionalmente desintoxicadas) que lisan membranas de células eucariotas

(hemolisinas, leucotoxina, leucocidina); *Staphylococcus epidermidis*: particularmente, antígeno asociado al limo de *S. epidermidis* (SAA); *Staphylococcus saprophyticus*: (causando infecciones del tracto urinario) particularmente la hemaglutinina de 160 kDa del antígeno de *S. saprophyticus*; *Pseudomonas aeruginosa*: particularmente, endotoxina A, proteína Wzz, LPS de *P. aeruginosa*, más particularmente LPS aislada de PAO1 (serotipo O5), y/o Proteínas de la Membrana Externa, incluyendo Proteínas F de la Membrana Externa (OprF) (Price et al. (2001) *Infec. Immun.* 69(5):3510-3515); *Bacillus anthracis* (anthrax): como antígenos de *B. anthracis* (opcionalmente deintoxicados) de componentes A /factor letal (LF) y factor de edema (EF)), los cuales pueden compartir un componente B común conocido como antígeno protector (PA); *Moraxella catarrhalis*: (respiratorio) incluyendo antígenos de proteínas de la membrana externa (HMW-OMP), antígeno C y/o LPS; *Yersinia pestis* (plaga): como antígeno capsular F1 (Grosveld et al. (2003) *Infec. Immun.* 71 (1):374-383), LPS (Fields et al. (1999) *Infec. Immun.* 67(10):5395), *Yersinia pestis* V antígeno (Hill et al. (1997) *Infec. Immun.* 65(11):4476-4482); *Yersinia enterocolitica* (patógeno gastrointestinal): particularmente LPS (Xu et al. (2002) *Infec. Immun.* 70(8):4414-4420); *Yersinia pseudotuberculosis*: antígenos de patógeno gastrointestinal; *Mycobacterium tuberculosis*: como lipoproteínas, LPS, antígenos de BCG, una proteína de fusión del antígeno 85B (Ag85B) y/o ESAT-6 opcionalmente formulado en vesículas de lípidos catiónicos (Olsen et al. (2004) *Infec. Immun.* 72(10):6148-6150), *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) antígenos asociados a isocitrato deshidrogenasa Banerjee et al. (2004) *Proc. Nat'l Acad. Sci USA* 101(34):12652-12657) y/o antígenos de MPT51 (Suzuki et al. (2004) *Infec. Immun.* 72(7):3829-3837); *Legionella pneumophila* (Enfermedad del legionario): antígenos de *L. pneumophila* -- derivada opcionalmente de líneas celulares con genes *asd* interrumpidos (Harb et al. (1998) *Infec. Immun.* 66(5):1898-1903); *Rickettsia*: incluyendo proteínas de la membrana externa, incluyendo la proteína A y/o Bde la membrana externa (OmpB) (*Biochim Biophys Acta.* 2004 Nov 1;1702(2):145), LPS, y antígeno de proteínas de superficie (SPA) (*J Autoimmun.* 1989 Jun;2 Suppl:81); *E. coli*: incluyendo antígenos de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), *E. coli* difusamente adherente (DAEC), *E. coli* enteropatógeno (EPEC), y/o *E. coli* enterohemorrágico (EHEC); *Vibrio cholerae*: incluyendo antígenos de proteinasa, LPS, particularmente liposacáridos de *Vibrio cholerae* II, polisacáridos O específicos de Inaba O1, V. cholera 0139, antígenos de vacuna IEM108 *Infect Immun.* 2003 Oct;71(10):5498-504), y/o toxina Zonula occludens (zot); *Salmonella typhi*: (fiebre tifoidea): incluyendo polisacáridos capsulares preferiblemente conjugados (Vi, es decir *vax-TyVi*); *Salmonella typhimurium* (gastroenteritis): antígenos derivados de los mismos se contemplan para terapias microbianas y de cáncer, incluyendo inhibición de angiogénesis y modulación de *flk*; *Listeria monocytogenes* (infecciones sistémicas en gente inmunocomprometida o anciana, infecciones de fetos): los antígenos derivados de *L. monocytogenes* son usados preferiblemente como portadores/vectores para la administración intracitoplásmica de conjugados/composiciones asociadas de la presente invención; *Porphyromonas gingivalis*: particularmente, proteína de la membrana externa (OMP) de *P. gingivalis*; *Tetanus*: como antígenos del toxoide tetánico (TT), usados preferiblemente como una proteína portadora en conjunción/conjugados con las composiciones de la presente invención; *Diphtheria*: como un toxoide de difteria, preferiblemente CRM₁₉₇, adicionalmente se contemplan antígenos capaces de modular, inhibir o asociados con la ribosilación de ADS para la combinación/co-administración/conjugación con las composiciones de la presente invención, los toxoides de difteria se usan preferiblemente como proteínas portadoras; *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme). como antígenos asociados con P39 y P13 (una proteína de la membrana integral, Noppa et al. (2001) *Infec. Immun.* 69(5):3323), *VlsE* Antigenic Variation Protein (Lawrenz et al. (1999) *J Clin Microbiol.* 37(12):3997); *Haemophilus influenzae B*: como un antígeno sacárido de la misma; *Klebsiella*: como un OMP, incluyendo OMP A, o un polisacárido opcionalmente conjugado con toxoide tetánico; *Neisseria gonorrhoeae*: incluyendo una proteína Por (o porina), como PorB (ver Zhu et al., *Vaccine* (2004) 22:660 - 669), una proteína de enlace de transferencia, como TbpA y TbpB (Ver Price et al., *Infection and Immunity* (2004) 71(1):277 - 283), una proteína de opacidad (como Opa), una proteína de reducción modificable (Rmp), y preparaciones de vesículas de la membrana externa (OMV) (ver Plante et al., *J Infectious Disease* (2000) 182:848 - 855), ver también , por ejemplo WO99/24578, WO99/36544, WO99/57280, WO02/079243); *Chlamydia pneumoniae*: particularmente antígenos de proteínas de *C. pneumoniae*; *Chlamydia trachomatis*: incluyendo antígenos derivados de los serotipos A, B, Ba y C son (agentes de tracoma, una causa de ceguera), serotipos L₁, L₂ y L₃ (asociados con el linfogranuloma venéreo), y los serotipos, D-K; *Treponema pallidum* (Sífilis): particularmente un antígeno TmpA; y *Haemophilus ducreyi* (causando chancroide): incluyendo proteína de la membrana externa (DsrA).

Cuando no se ha ce referencia específicamente, los antígenos bacterianos que codifican secuencias adicionales de la invención pueden ser antígenos capsulares, antígenos de polisacáridos o antígenos de proteínas de cualquiera de los anteriores. Los antígenos bacterianos adicionales pueden también incluir una preparación de vesículas de la membrana externa (OMV). Adicionalmente, los antígenos incluyen versiones vivas, atenuadas, divididas y/o purificadas de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas. Los antígenos derivados de bacterias o microbios de la presente invención pueden ser gram-negativos o gram-positivos y aeróbicos o anaeróbicos.

Adicionalmente, cualquiera de los sacáridos derivados de bacterias (polisacáridos, LPS LOS u oligosacáridos) pueden ser conjugados con otro agente o antígeno, como una proteína portadora (por ejemplo CRM₁₉₇). Dicha conjugación puede ser conjugación directa efectuada por aminación reductora de las fracciones carbonilo en los grupos sacárido a amino en la proteína, como se dispone en la Patente US N° 5.360.897 y Can *JBiochem Cell Biol.* 1984 May;62(5):270-5. Alternativamente, los sacáridos se pueden conjugar a través de un conector, como, con succinamida u otros ligamientos proporcionados en Bioconjugate Techniques, 1996 y CRC,

Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, 1993.

La secuencia heteróloga puede también codificar uno o más antígenos virales, por ejemplo, *Gripe*: incluyendo partículas virales completas (atenuadas), divididas o subunidades que comprenden proteínas de superficie de hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA), los antígenos de la gripe pueden estar derivados de embriones de pollo o propagados en cultivo celular, y/o los antígenos de la gripe están derivados de gripe tipo A, B y/o C, entre otras; *Virus respiratorio sincitial (RSV)*: incluyendo la proteína F de la cepa A2 del RSV (J Gen Virol. 2004 Nov; 85(Pt 11):3229) y/o la glicoproteína G; *Virus paragripal (PIV)*: incluyendo PIV tipo 1, 2, y 3, preferiblemente conteniendo glicoproteínas hemaglutinina, neuraminidasa y/o de fusión; *Poliovirus*: incluyendo antígenos de una familia de picornaviridae, preferiblemente antígenos de poliovirus como el OPV o ,preferiblemente IPV; *Sarampión*: incluyendo antígeno de virus de sarampión dividido (MV) combinado opcionalmente con el Protollin y/o antígenos presentes en la vacuna MMR; *Paperas*: incluyendo antígenos presentes en la vacuna MMR; *Rubeola*: incluyendo antígenos presentes en la vacuna MMR así como otros antígenos de Togaviridae, incluyendo virus del dengue; *Rabia*: como virus inactivados liofilizados (RabAvert™); *virus Flaviviridae*: como (y antígenos derivados del mismo) virus de la fiebre amarilla, virus de Encefalitis japonesa, virus del dengue (tipos 1, 2, 3 o 4), virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, y virus del Nilo Occidental; *Caliciviridae*: antígenos del mismos; *VIH*: incluyendo antígenos de las cepas VIH-1 o VIH-2, como gag (p24gag y p55gag), env (gp160 y gp41), pol, tat, nef, rev vpu, miniproteínas (preferiblemente p55 gag y gp140v eliminado) y antígenos de los aislados HIV_{IIb}, HIV_{SF2}, HIV_{LAV}, HIV_{LAI}, HIV_{MN}, HIV-1_{CM235}, HIV-1_{US4}, HIV-2; virus de la inmunodeficiencia simia (SIV) entre otros; *Rotavirus*: incluyendo proteínas VP4, VP5, VP6, VP7, VP8 (Protein Expr Purif. 2004 Dec;38(2):205) y/o NSP4; *Pestivirus*: como antígenos del virus de la fiebre porcina clásica, virus de la diarrea viral bovina, y/o virus de la enfermedad de la frontera; *Parvovirus*: como parvovirus B 19; *Coronavirus*: incluyendo antígenos del virus SARS, particularmente proteína de la espícula o proteasas de la misma, así como antígenos incluidos en la WO 04/82360; *virus de la Hepatitis A*: como virus inactivados; *virus de la Hepatitis B*: como los antígenos de la superficie y/o el núcleo (sAg), así como las secuencias de presuperficie, pre-S1 y pre-S2 (llamadas anteriormente pre-S), así como combinaciones de los anteriores, como sAg/pre-S1, sAg/pre-S2, sAg/pre-S1/pre-S2 y pre-S1/pre-S2, (ver, por ejemplo, "HBV Vaccines - Human Vaccines and Vaccination, pp. 159-176; and Patentes U.S. N° 4,722,840, 5,098,704, 5,324,513; Beames et al., J. Virol. (1995) 69:6833-6838, Birnbaum et al., J. Virol. (1990) 64:3319-3330; y Zhou et al., J. Virol. (1991) 65:5457-5464); *virus de la Hepatitis C*: como E1, E2, E1/E2 (ver, Houghton et al., Hepatology (1991) 14:381), poliproteína NS345, poliproteína de núcleo de NS 345, núcleo y/o péptidos de regiones no estructurales (Publicaciones Internacionales N° WO 89/04669; WO 90/11089; and WO 90/14436; *Virus de la hepatitis delta (HDV)*: antígenos derivados del mismo, particularmente antígeno δ de HDV (ver, por ejemplo, patente U.S. N° 5.378.814); *Virus de la Hepatitis E (HEV)*: antígenos derivados del mismo; *virus de la Hepatitis G (HGV)*, antígenos derivados del mismo; *virus de la varicela zoster*: antígenos derivados del virus de la varicela zoster VZV) (J. Gen. Virol. (1986) 67:1759); *virus de Epstein-Barr*: antígenos derivados del EBV (Baer et al., Nature (1984) 310:207); *Citomegalovirus*: antígenos de CMV incluyendo gB y gH (Cytomegaloviruses (J.K. McDougall, ed., Springer-Verlag 1990) pp. 125-169); *Virus del herpes simple*: incluyendo antígenos de cepas HSV-1 o HSV-2 y glicoproteínas gB, gD y gH (McGeoch et al., J. Gen. Virol. (1988) 69:1531 y Patente U.S. N° 5.171.568); *Virus de herpes humano*: antígenos derivados de otros virus de herpes humanos como HHV6 y HHV7; y *HPV*: incluyendo antígenos asociados con o derivados del virus del papiloma humano (HPV), por ejemplo, uno o más de E1 - E7, L1, L2, y fusiones de los mismos, particularmente las composiciones de la invención pueden incluir partículas similares a virus (VLP) que comprenden la proteína de la cápside principal L1, todavía más particularmente, los antígenos de HPV son protectores contra uno o más serotipos de HPV 6, 11, 16 y/o 18.

Además se proporcionan antígenos, composiciones, métodos y microbios incluidos en Vaccines, 4ª Edición (Plotkin and Orenstein ed. 2004); Medical Microbiology 4ª Edición (Murray et al. ed. 2002); Virology, 3ª Edición (W.K. Joklik ed. 1988); Fundamental Virology, 2ª Edición (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds. 1991), que se contemplan en conjunción con las composiciones de la presente invención.

Adicionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar uno o más antígenos fúngicos incluyendo, pero no limitado a, los descritos en las Patentes U.S: N° 4.229.434 y 4.368.191 para la profilaxis y el tratamiento de la tricofitosis causada por mentagrofitos de Trichophyton; Patentes U.S. N° 5.277.904 y 5.284.652 para una vacuna contra dermatofitos de amplio espectro para la profilaxis de infecciones de dermatofitos en animales, como conejillos de indias, gatos, conejos, caballos y corderos, estos antígenos comprenden una suspensión de *T. equinum* *T. mentagrophytes* (var. Granulare), *M. canis* y/o *M. gypseum* muertas en una cantidad efectiva opcionalmente combinados con un adyuvante; Patente U.S. N° 5.453.273 y 6.132.733 para una vacuna contra la tiña que comprende una cantidad efectiva de hongos matados con formaldehído homogeneizados, es decir cultivo *Microsporum canis* en un portador; Patente U.S. N° 5.948.413 que implica proteínas extracelulares e intracelulares para pitiosis. Antígenos adicionales identificados en vacunas antifúngicas incluyen Ringvac bovis LTF-130 y Bioveta.

Además, antígenos fúngicos para su uso en la presente pueden derivarse de dermatofitos, incluyendo; Epidermophyton floccosum, Microsporum audouini, Microsporum canis, Microsporum distortum, Microsporum equinum, Microsporum yeso, Microsporum nanum, Trichophyton concentricum, Trichophyton equinum, Trichophyton gallinae, Trichophyton gypseum, Trichophyton megnini, Trichophyton mentagrophytes, Trichophyton quinckeanum, Trichophyton rubrum, Trichophyton schoenleini, Trichophyton tonsurans, Trichophyton verrucosum, T. verrucosum

var. album, var. discoideas, var. ochraceum, Trichophyton violaceum, y/o Trichophyton faviforme.

Los patógenos fúngicos para su uso como antígenos o en la derivación de antígenos en conjunción con las composiciones de la presente invención comprenden *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sydowi*, *Aspergillus flavatus*, *Aspergillus glaucus*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Candida albicans*, *Candida enolasa*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida kusei*, *Candida parakwsei*, *Candida lusitanae*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondi*, *carrionii Cladosporium*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum clavatum*, *Histoplasma capsulatum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pneumocystis carinii*, *Pythium insidiosum*, *Pityrosporum ovale*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces pombe*, *Scedosporium apiosperum*, *Sporothrix schenckii*, *Trichosporon beigellii*, *Toxoplasma gondii*, *Penicillium marneffeii*, *Malassezia spp.*, *Fonsecaea spp.*, *Wangiella spp.*, *Sporothrix spp.*, *Basidiobolus spp.*, *Conidiobolus spp.*, *Rhizopus spp*, *Mucor spp*, *Absidia spp*, *Mortierella spp*, *Cunninghamella spp*, y *Saksenaia spp*.

Otros hongos de los que se derivan los antígenos incluyen *Alternaria spp*, *Curvularia spp*, *Helminthosporium spp*, *Fusarium spp*, *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, *Monolinia spp*, *Rhizoctonia spp*, *Paecilomyces spp*, *Pithomyces spp*, y *Cladosporium spp*.

Las secuencias heterólogas como se describen en la presente pueden codificar uno o más antígenos tumorales o de cáncer, incluyendo pero no limitado a, un antígeno tumoral que contiene sacáridos, como un antígeno tumoral glicolípidico o un antígeno tumoral gangliósido. Se conocen numerosos antígenos tumorales en la técnica, incluyendo: (a) antígenos de cáncer de testículo como NY-ESO-1, SSSX2, SCP1 así como RAGE, BAGE, GAGE y la familia MAGE polipéptidos, por ejemplo, GAGE-1, GAGE-2, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, y MAGE-12 (que pueden ser usados, por ejemplo, para dirigirse a tumores de melanoma, pulmón, cabeza y cuello, NSCLC, mama, gastrointestinales, y vejiga), (b) antígenos mutados, por ejemplo, p53 (asociado con varios tumores sólidos, por ejemplo, cáncer colorrectal, de pulmón, cabeza y cuello), p21/Ras (asociados con, por ejemplo, melanoma, cáncer de páncreas y cáncer colorrectal), CDK4 (asociado con, por ejemplo, melanoma), MUM1 (asociado con, por ejemplo, melanoma), caspase-8 (asociado con, por ejemplo, cáncer de cabeza y cuello), CIA 0205 (asociado con, por ejemplo, cáncer de vejiga, HLA-A2-R1701, beta catenina (asociado con, por ejemplo, melanoma), TCR (Asociado con, por ejemplo, linfoma de células T no de Hodgkins), BCR-abl (asociado con, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), somerasa triosafosfato, KIA 0205, CDC-27, y LDLR-FUT, (c) antígenos sobre-expresados, por ejemplo, galectina 4 (asociado con, por ejemplo, cáncer colorrectal), galectina 9 (asociado con, por ejemplo, la enfermedad de Hodgkin), proteinasa 3 (asociado con, por ejemplo, leucemia mielógena crónica), WT 1 (asociado con, por ejemplo, diversas leucemias), carbónico anhidrasa (asociado con, por ejemplo, cáncer renal), aldolasa A (asociado con, por ejemplo, cáncer de pulmón), PRAME (asociado con, por ejemplo, melanoma), HER-2/neu (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, colon, pulmón y de ovario), alfa-fetoproteína (asociado con, por ejemplo, hepatoma), KSA (asociado con, por ejemplo, cáncer colorrectal), gastrina (asociado con, por ejemplo, cáncer de páncreas y gástrico), proteína catalítica de la telomerasa, MUC-1 (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama y de ovario), G-250 (asociado con, por ejemplo, carcinoma de células renales), p53 (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, de colon), y antígeno carcinoembrionario (asociado con, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón y cánceres del tracto gastrointestinal, tales como cáncer colorrectal), (d) antígenos compartidos, por ejemplo, antígenos de diferenciación melanoma-melanocito como MART-1/Melan A, gp100, MC1R, receptor de la hormona estimulante de melanocitos, tirosinasa, proteína-1/TRP1 relacionada con la tirosinasa y proteína-2/TRP2 relacionada con tirosinasa (asociado con, por ejemplo, melanoma), (e) antígenos asociados con la próstata como PAP, PSA, PSMA, PSH-P1, PSM-P1, PSM-P2, asociados con, por ejemplo, el cáncer de próstata, (f) idiotipos de inmunoglobulina (asociados con mieloma y linfomas de células B, por ejemplo), y (g) otros antígenos tumorales, como antígenos que contienen polipéptidos y sacáridos incluyendo (i) glicoproteínas como sialil Tn y sialil Le^x (asociadas con, por ejemplo, cáncer colorrectal y de mama) así como varias mucinas; glicoproteínas que pueden ser acopladas a una proteína portadora (por ejemplo, MUC-1 puede ser acoplada a KLH); (ii) lipopolipéptidos (por ejemplo, MUC-1 ligado a una fracción lipídica); (iii) polisacáridos (por ejemplo, hexasacárido sintético Globo H) que pueden ser acoplados a proteínas portadoras (por ejemplo, a KLH), (iv) gangliósidos como GM2, GM12, GD2, GD3 (asociados con, por ejemplo, cáncer de pulmón, cerebro, melanoma), que también pueden ser acoplados a proteínas portadoras (por ejemplo, KLH).

Antígenos tumorales adicionales que son conocidos en la técnica incluyen p 15, Hom / Mel-40, H-Ras, E2A-PRL, H4-RET, CIB-IGK, MYL-RAR, antígenos del virus de Epstein Barr, EBNA, antígenos de virus del papiloma humano (VPH), incluyendo E6 y E7, antígenos de virus de hepatitis B y C, antígenos del virus linfotrópico de células T humano TSP-180, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, mn-23H1, TAG-72-4, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras, p16, TAGE, PSCA, CT7, 43-9F, 5T4, 791 Tgp72, beta-HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3 (CA 27.29/BCAA), CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68/KP1, CO-029, FGF-5, Ga733 (Ep- CAM), HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90 (proteína de enlace Mac-2/proteína C-asociada a ciclofilina), TAAL6, TAG72, TLP, TPS y similares. Estas así como otros componentes celulares se describen por ejemplo en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 20020007173 y las referencias citadas en la misma.

Información adicional de antígenos tumorales y de cáncer se pueden encontrar, por ejemplo, en Moingeon P, "Cancer vaccines," *Vaccine*, 2001, 19:1305-1326; Rosenberg SA, "Progress in human tumor immunology and immunotherapy," *Nature*, 2001, 411:380-384; Dermine, S. et al, "Cancer Vaccines and Immunotherapy," *British Medical Bulletin*, 2002, 62, 149-162; Espinoza-Delgado I., "Cancer Vaccines," *The Oncologist*, 2002, 7(suppl3):20-33; Davis, I.D. et al., "Rational approaches to human cancer immunotherapy," *Journal of Leukocyte Biology*, 2003, 23: 3-29; Van den Eynde B, et al., "New tumor antigens recognized by T cells," *Curr. Opin. Immunol.*, 1995, 7:674-81; Rosenberg SA, "Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens," *Immunol. Today*, 1997, 18:175-82; Offringa R et al., "Design and evaluation of antigen-specific vaccination strategies against cancer," *Current Opin. Immunol.*, 2000, 2:576-582; Rosenberg SA, "A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens," *Immunity*, 1999, 10:281-7; Sahin U et al., "Serological identification of human tumor antigens," *Curr. Opin. Immunol.*, 1997, 9:709-16; Old LJ et al., "New paths in human cancer serology," *J. Exp. Med.*, 1998, 187:1163-7; Chauv P, et al., "Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4(+) T lymphocytes," *J. Exp. Med.*, 1999, 189:767-78; Gold P, et al., "Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system," *J. Exp. Med.*, 1965, 122:467-8; Livingston PO, et al., "Carbohydrate vaccines that induce antibodies against cancer: Rationale," *Cancer Immunol. Immunother.*, 1997, 45:1-6; Livingston PO, et al., "Carbohydrate vaccines that induce antibodies against cancer: Previous experience and future plans," *Cancer Immunol. Immunother.*, 1997, 45:10-9; Taylor-Papadimitriou J, "Biology, biochemistry and immunology of carcinoma-associated mucins," *Immunol. Today*, 1997, 18:105-7; Zhao X-J et al., "GD2 oligosaccharide: target for cytotoxic T lymphocytes," *J. Exp. Med.*, 1995, 182:67-74; Theobald M, et al., "Targeting p53 as a general tumor antigen," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92:11993-7; Gaudernack G, "T cell responses against mutant ras: a basis for novel cancer vaccines," *Immunotechnology*, 1996, 2:3-9; WO 91/02062; Patente U.S. N° 6.015.567; WO O 1/08636; WO 96/30514; Patente U.S. N° 5.846.538; y Patente U.S. N° 5.869.445.

25 FORMULACIONES

También se proporcionan las composiciones farmacéuticas que comprenden las secuencias, vectores y partículas producidas usando estas moléculas descritas en la presente, por ejemplo una población de partículas de replicones de alfavirus producidas usando un constructo auxiliar que comprende una secuencia de amplificación 5' modificada con una longitud de entre 10 y 150 nucleótidos en combinación con un portador, diluyente o recipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones descritas en la presente pueden incluir varios excipientes, adyuvantes, portadores, sustancias auxiliares, agentes moduladores y similares. Como se ha señalado anteriormente, las composiciones de la invención también pueden contener líquidos o excipientes, como agua, solución salina, glicerol, dextrosa, etanol o similares, individualmente o en combinación, así como sustancias como agentes humectantes, agentes emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. Un debate a fondo de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. 20ª ed ISBN: 0683306472.

También se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables en las composiciones de la invención, por ejemplo, sales minerales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, o sulfatos, así como sales de ácidos orgánicos como acetatos, propionatos, malonatos o benzoatos. Sustratos de proteínas especialmente útiles son albúminas de suero, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico, y otras proteínas bien conocidas por los expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en la presente (por ejemplo, partículas) pueden ser conservadas en forma bruta o purificada, que también pueden estar liofilizadas, secadas por aspersion o evaporadas, por ejemplo como se describe en detalle en la Patente U.S. N° 6.015.686.

Como se ha señalado anteriormente, las formulaciones descritas en la presente pueden incluir además o pueden ser administradas en conjunción con otros agentes inmunoreguladores. En particular, las composiciones incluirán típicamente un adyuvante. Los adyuvantes para su uso con la invención incluyen, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes expuestos a continuación:

55 *Composiciones que contienen minerales*

Las composiciones que contienen minerales adecuadas para su uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales como hidróxidos (por ejemplo oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. (por ejemplo ver capítulos 8 y 9 de *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell & Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.), o mezclas de diferentes compuestos minerales (por ejemplo, una mezcla de un fosfato y un adyuvante de hidróxido, opcionalmente con un exceso del fosfato), con los compuestos tomando cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalino, amorfo, etc.) y prefiriéndose con la adsorción de las sales. Las composiciones que contienen minerales también pueden ser formuladas como una partícula de sal de metal (WO00/23105).

Las sales de aluminio se pueden incluir en vacunas de la invención de tal forma que la dosis de Al^{3+} está entre 0,2 y 1,0 mg por dosis.

5 En una realización el adyuvante basado en aluminio es alumbre (sulfato de aluminio y potasio $(AlK(SO_4)_2)$), o un derivado de alumbre, como el formado in situ mezclando un antígeno en tampón de fosfato con alumbre, seguido por la titulación y precipitación con una base como hidróxido de amonio o hidróxido de sodio.

10 Otro adyuvante basado en aluminio para su uso con las composiciones inmunogénicas descritas en la presente es el adyuvante de hidróxido de aluminio $(Al(OH)_3)$ o oxihidróxido de aluminio cristalino $(AlOOH)$, que es un adsorbente excelente, teniendo un área de superficie de aproximadamente $500m^2/g$. Alternativamente, se proporciona el adyuvante de fosfato de aluminio $(AlPO_4)$ o hidroxifosfato de aluminio, que contiene grupos fosfato en lugar de algunos o todos los grupos hidroxilo del adyuvante de hidróxido de aluminio. Los adyuvantes de fosfato de aluminio preferidos proporcionados en la presente son amorfos y solubles en medio ácido, básico neutro.

15 En otra realización, el adyuvante comprende tanto fosfato de aluminio como hidróxido de aluminio. En una realización más particular de los mismos, el adyuvante tiene una cantidad mayor de fosfato de aluminio que de hidróxido de aluminio, como una proporción de 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1,9:1 o mayor de 9:1, por peso de fosfato de aluminio a hidróxido de aluminio. Más concretamente aún, las sales de aluminio en la vacuna están presentes a 0,4 a 4,0 mg por dosis de vacuna, o 0,4 a 0,8 mg por dosis de vacuna, o 0,5 a 0,7 mg por dosis de vacuna, o alrededor de 0,6 mg por dosis de vacuna.

20 Generalmente, los adyuvantes basados en aluminio preferidos, o proporción de adyuvantes basados en aluminio múltiples, como fosfato de aluminio a hidróxido de aluminio es seleccionada por optimización de la atracción electrostática entre moléculas de tal forma que el antígeno lleva una carga opuesta como el adyuvante en el pH deseado. Por ejemplo, adyuvante de fosfato de aluminio (iep = 4) adsorbe lisozima, pero no albúmina a pH 7,4. En caso de que la albúmina sea el objetivo, se seleccionará el adyuvante de hidróxido de aluminio (iep 11,4). Alternativamente, el pretratamiento de hidróxido de aluminio con fosfato disminuye su punto isoeléctrico, haciéndolo un adyuvante preferido para antígenos más básicos.

30 A. Emulsiones de Aceite

Las composiciones de emulsiones de aceite adecuadas para su uso como adyuvantes incluyen emulsiones de escualeno-agua, como la MF59 (5% de Escualeno, 0,5% de Tween 80, y 0,5% de Span 85, formulada en partículas submicrométricas usando un microfluidizador). Ver la WO90/14837. Ver también, Podda, "The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine", Vaccine (2001) 19: 2673-2680; Frey et al., "Comparison of the safety, tolerability, and immunogenicity of a MF59-adjuvanted influenza vaccine and a non-adjuvanted influenza vaccine in non-elderly adults", Vaccine (2003) 21:4234-4237. La MF59 se usa como adyuvante en la vacuna de subunidad trivalente del virus de la gripe FLAD™.

40 Los adyuvantes particularmente preferidos para su uso con las composiciones inmunogénicas descritas en la presente son emulsiones de aceite en agua submicrométricas. Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas preferidas para su uso en la presente son emulsiones de escualeno/agua que contienen opcionalmente cantidades variables de MTP-PE™, como una emulsión de aceite en agua submicrométrica que contiene 4-5% p/v de escualeno, 0,25-1,0 % p/v de Tween (monooleato de polioxietileno sorbitán=, y/o 0,25-1,0% de Span 85™ (trioleato de sorbitán) y, opcionalmente, N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (MTP-PE), por ejemplo, la emulsión de aceite en agua submicrométrica conocida como "MF59" (Publicación Internacional N° WO90/14837; Patentes U.S. N° 6.299.884 y 6.451.325 y Ott et al., "MF59 -- Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines" in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell, M.F. and Newman, M.J. eds.) Plenum Press, New York, 1995, pp. 277-296). La MF59 contiene 4-5% p/v de Escualeno (por ejemplo, 4,3%), 0,25-0,5% p/v de Tween 80™ y 0,5% p/v de Span 85™ y contiene opcionalmente varias cantidades de MTP-PE, formulada en partículas submicrométricas usando un microfluidizador como el microfluidizador Model 110Y (Microfluidics, Newton, MA). Por ejemplo, el MTP-PE puede estar presente en una cantidad de alrededor de 0-500 µg/dosis, más preferiblemente 0-250 µg/dosis y más preferiblemente, 0-100 µg/dosis. Como se usa en la presente, el término "MF59-0" se refiere a la emulsión de aceite en agua submicrométrica anterior que carece de MTP-PE, mientras que el término MF59-MTP denota una formulación que contiene MTP-PE. Por ejemplo, "MF59-100" contiene 100 µg de MTP-PE por dosis, etcétera. La MF69, otra emulsión de aceite en agua submicrométrica para su uso en la presente, contiene un 4,3% p/v de escualeno, 0,25% p/v de Tween 80™, y 0,75% p/v de Span 85™ y opcionalmente MTP-PE. Otra emulsión de aceite en agua submicrométrica es la MF75, también conocida como SAF, que contiene un 10% de escualeno, un 0,4% de Tween 80™, un 5% de polímero plurónico-bloqueado L121, y thr-MDP, también microfluidizada en una emulsión submicrométrica. MF75-MTP denota una formulación de MF75 que incluye MTP, como de 100-400 µg de MTP-PE por dosis.

65 Las emulsiones de aceite en agua submicrométricas, métodos para hacer las mismas y agentes

inmunoestimulantes, como péptidos de muramilo, para su uso en las composiciones, se describen con detalle en la Publicación Internacional N° WO90/14837 y las Patentes US N° 6.299.884 y 6.451.325.

5 También se pueden usar el adyuvante completo de Freund (CFA) y el adyuvante incompleto de Freund (IFA) como adyuvantes en la invención.

B. Formulaciones de Saponina

10 Las formulaciones de saponina también pueden ser usadas como adyuvantes. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esteroles y glucósidos de triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia gama de especies vegetales. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol de *Quillaja saponaria* Molina se han estudiado ampliamente como adyuvantes. Las saponinas también pueden ser obtenidas comercialmente de *Ornata Smilax* (zarcaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novias), y *Saponaria officinalis* (raíz de jabón). Las formulaciones de adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, como la QS21, así como formulaciones lipídicas, como las ISCOMs.

15 Las composiciones de saponina han sido purificadas usando Cromatografía de Capa Fina de Alto Rendimiento (HP-TLC) y Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento de Fase Inversa (RP-HPLC). Se han identificado las fracciones purificadas específicas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es QS21. Un método para la producción de la QS21 se divulga en la Patente U.S. N° 5.057.540. Las formulaciones de saponina pueden también comprender un esteroles, como el colesterol (ver WO96/33739).

20 Las combinaciones de saponinas y colesterol pueden ser usadas para formar partículas únicas llamadas Complejos Inmunoestimulantes (ISCOMs). Los ISCOMs también incluyen típicamente un fosfolípido como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Se puede usar cualquier saponina conocida en los ISCOMs. Preferiblemente, el ISCOM incluye uno o más de Quil A, QHA y QHC. Los ISCOMs se describen adicionalmente en la EP0109942, WO96/11711 y WO96/33739. Opcionalmente, los ISCOMs pueden estar vacíos de detergentes adicionales. Ver la WO00/07621.

25 Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina se puede encontrar en Barr, et al., "ISCOMs and other saponin based adjuvants", *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) 32:247-271. Ver también, Sjolander, et al., "Uptake and adjuvant activity of orally delivered saponin and ISCOM vaccines", *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998) 32:321-338.

30 C. Virosomas y Partículas Similares a Virus (VLPs)

También se pueden usar Virosomas y Partículas Similares a Virus (VLPs) como adyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus combinado opcionalmente o formulado con un fosfolípido. Son generalmente no patógenos, no replicantes y generalmente no contienen nada del genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden ser producidas de forma recombinante o aisladas de virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para su uso en virosomas o VLPs incluyen proteínas derivadas de virus de la gripe (como HA o NA), virus de la Hepatitis B (como proteínas de la cápsida o el núcleo), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de la Fiebre Aftosa, retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, Q β -fago (tales como proteínas de la cubierta), GA-fago, fr-fago, AP205 fago, y Ty (como proteína p1 de retrotransposón Ty). Las VLPs se analizan adicionalmente en la WO03/024480, WO03/024481 y Niikura et al., "Chimeric Recombinant Hepatitis E Virus-Like Particles as an Oral Vaccine Vehicle Presenting Foreign Epitopes", *Virology* (2002) 293:273-280; Lenz et al., "Papillomavirus-Like Particles Induce Acute Activation of Dendritic Cells", *Journal of Immunology* (2001) 5246-5355; Pinto, et al., "Cellular Immune Responses to Human Papillomavirus (HPV)-16 L1 Healthy Volunteers Immunized with Recombinant HPV-16 L1 Virus-Like Particles", *Journal of Infectious Diseases* (2003) 188:327-338; and Gerber et al., "Human Papillomavirus Virus-Like Particles Are Efficient Oral Immunogens when Coadministered with Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin Mutant R192G or CpG", *Journal of Virology* (2001) 75(10):4752-4760. Virosomas are discussed further in, for example, Gluck et al., "New Technology Platforms in the Development of Vaccines for the Future", *Vaccine* (2002) 20:B10 - B16. Los virosomas de la gripe reconstituidos inmunopotenciadores (IRIV) se usan como el sistema de administración de antígenos de subunidad en el producto INFLEXAL™ trivalente intranasal {Mischler & Metcalfe (2002) *Vaccine* 20 Suppl 5:B17-23} y el producto INFLUVAC PLUS™.

60 D. Derivados Bacterianos y Microbianos

Los adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos y microbianos como:

65 (1) *Derivados no tóxicos de lipopolisacáridos enterobacterianos (LPS)*

Dichos derivados incluyen Monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). El 3dMPL es una mezcla de 3 Des-O-acilado monofosforil lípido A con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. Una forma de "partícula pequeña" preferida de 3 Des-O-acilado monofosforil lípido A se divulga en la EP 0689454. Dichas "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para ser filtradas de forma estéril a través de una membrana de 0,22 micras (ver EP 0689454). Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen imitadores de monofosforil lípido A, como derivados de aminoalquilo glucosaminida fosfato, por ejemplo RC-529. Ver Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9:2273-2278.

(2) Derivados de Lípido A

Los derivados de lípido A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* como el OM-174. El OM-174 se describe por ejemplo en Meraldi et al., "OM-174, a New Adjuvant with a Potential for Human Use, Induces a Protective Response with Administered with the Synthetic C-Terminal Fragment 242-310 from the circumsporozoite protein of *Plasmodium berghei*", *Vaccine* (2003) 21:2485-2491; y Pajak, et al., "The Adjuvant OM-174 induces both the migration and maturation of murine dendritic cells in vivo", *Vaccine* (2003) 21:836-842.

(3) Oligonucleótidos inmunoestimulantes

Los oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia que contiene una citosina no metilada seguida por guanosina y ligada por un enlace de fosfato). El ARN bicatenario bacteriano u oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(DG) también han mostrado ser inmunoestimulantes.

Los CpG's pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos como modificaciones de fosforotioato y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Opcionalmente, la guanosina puede ser reemplazado con un análogo como 2'-desoxi-7-desazaguanosina. Ver Kandimalla, et al., "Divergent synthetic nucleotide motif recognition pattern: design and development of potent immunomodulatory oligodeoxyribonucleotide agents with distinct cytokine induction profiles", *Nucleic Acids Research* (2003) 31(9): 2393-2400; WO02/26757 y WO99/62923 para ejemplos de posibles sustituciones análogas. El efecto adyuvante de oligonucleótidos CpG se trata adicionalmente en Krieg, "CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?", *Nature Medicine* (2003) 9(7): 831-835; McCluskie, et al., "Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA", *FEMS Immunology and Medical Microbiology* (2002) 32:179-185; WO98/40100; Patente US N° 6.207.646; Patente US N° 6.239.116 y Patente US N° 6.429.199.

La secuencia CpG puede estar dirigida a TLR9, como el motivo GTCGTT o TTCGTT. Ver Kandimalla, et al., "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs", *Biochemical Society Transactions* (2003) 31 (parte 3): 654-658. La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune Th1, como una CpG-A ODN, o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, como una CpG-B ODN. Las CpG-A y CpG-B ODNs se discuten en Blackwell, et al., "CpG-A-Induced Monocyte IFN-gamma-Inducible Protein-10 Production is Regulated by Plasmacytoid Dendritic Cell Derived IFN-alpha", *J. Immunol.* (2003) 170(8):4061-4068; Krieg, "From A to Z on CpG", *TRENDS in Immunology* (2002) 23(2): 64-65 y la WO01/95935. Preferiblemente, el CpG es una CpG-A ODN.

Preferiblemente, el oligonucleótido CpG es construido de tal manera que el extremo 5' es accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos CpG pueden ser unidas en sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Ver, por ejemplo, Kandimalla, et al., "Secondary structures in CpG oligonucleotides affect immunostimulatory activity", *BBRC* (2003) 306:948-953; Kandimalla, et al., "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs", *Biochemical Society Transactions* (2003) 31(parte 3):664-658; Bhagat et al., "CpG penta- and hexadeoxyribonucleotides as potent immunomodulatory agents" *BBRC* (2003) 300:853-861 y WO03/035836.

(4) Toxinas ADP-ribosilantes y derivados desintoxicados de las mismas

Las toxinas ADP-ribosilantes bacterianas y derivados desintoxicados de las mismas pueden ser usadas como adyuvantes en la invención. Preferiblemente, la proteína se deriva de *E. coli* (es decir, enterotoxina lábil al calor de *E. coli* "LT", cólera ("CT"), o tosferina ("PT")). El uso de toxinas ADP-ribosilantes desintoxicadas como adyuvantes mucosales se describe en la WO95/1721 y como adyuvantes parenterales en la WO98/42375. Preferiblemente, el adyuvante es un mutante LT desintoxicado como LT-K63, LT-R72, y LTR192G. El uso de toxinas ADP-ribosilantes y derivados desintoxicados de las mismas, particularmente LT-K63 y LTR72, como adyuvantes se puede encontrar en las siguientes referencias: Beignon, et al., "The LTR72 Mutant of Heat-Labile Enterotoxin of *Escherichia coli* Enhances the Ability of Peptide Antigens to Elicit CD4+ T Cells and Secrete Gamma Interferon after Coapplication onto Bare Skin", *Infection and Immunity* (2002) 70(6):3012-3019; Pizza, et al., "Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants", *Vaccine* (2001) 19:2534-2541; Pizza, et al., "LTK63 and LTR72, two mucosal adjuvants ready for clinical trials" *Int. J. Med. Microbiol* (2000) 290(4-5):455-461; Scharton-Kersten et al., "Transcutaneous Immunization with Bacterial ADPRibosylating Exotoxins, Subunits and Unrelated

Adjuvants", *Infection and Immunity* (2000) 68(9):5306-5313; Ryan et al., "Mutants of *Escherichia coli* Heat-Labile Toxin Act as Effective Mucosal Adjuvants for Nasal Delivery of an Acellular Pertussis Vaccine: Differential Effects of the Nontoxic AB Complex and Enzyme Activity on Th1 and Th2 Cells" *Infection and Immunity* (1999) 67(12):6270-6280; Partidos et al., "Heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* and its site-directed mutant LTK63 enhance the proliferative and cytotoxic T-cell responses to intranasally co-immunized synthetic peptides", *Immunol. Lett.* (1999) 67(3):209-216; Peppoloni et al., "Mutants of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as safe and strong adjuvants for intranasal delivery of vaccines", *Vaccines* (2003) 2(2):285-293; and Pine et al., (2002) "Intranasal immunization with influenza vaccine and a detoxified mutant of heat labile enterotoxin from *Escherichia coli* (LTK63)" *J. Control Release* (2002) 85(1-3):263-270. La referencia numérica para sustituciones de aminoácidos está basada preferiblemente en los alineamientos de las subunidades A y B de las toxinas ADP-ribosilantes expuestas en Domenighini et al., *Mol. Microbiol* (1995) 15(6):1165-1167.

F. Bioadhesivos y mucoadhesivos

Los bioadhesivos y los mucoadhesivos también pueden ser usado como adyuvantes. Los bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas (Singh et al. (2001) *J. Cont. Rele.* 70:267-276) o mucoadhesivos como derivados reticulados de ácido poliacrílico, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. El quitosano y sus derivados también pueden ser usado como adyuvantes. Ver, por ejemplo WO99/279603.

G. Micropartículas

Las micropartículas también pueden ser usadas como adyuvantes. Se prefieren las micropartículas (es decir una partículas de ~100nm a ~150µm de diámetro, más preferiblemente de de ~200nm a ~30µm de diámetro, y más preferiblemente de de ~500nm a ~10µm de diámetro) formadas de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(ácido α-hidroxi), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicolida), tratados opcionalmente para tener una superficie cargada negativamente (por ejemplo con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo con un detergente catiónico, como CTAB).

H. Liposomas

Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como adyuvantes se describen en la Patente U.S. N° 6.090.406, Patente US N° 5.916.588 y EP 0626169.

I. Formulaciones de Éter de Polioxietileno y de Ester de Polioxietileno

Los adyuvantes adecuados para su uso con las composiciones inmunogénicas descritas en la presente incluyen éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno. WO99/52549. Dichas formulaciones incluyen adicionalmente surfactantes de éster de sorbitán de polioxietileno en combinación con un octoxinol (WO01/21207) así como surfactantes de ésteres o éteres de alquilo de polioxietileno en combinación con al menos un surfactante no iónico adicional como un octoxinol (WO01/21152).

Los éteres de polioxietileno preferidos son seleccionados del grupo siguiente: polioxietileno-9-lauril éter (laureth 9), éter de polioxietileno-9-stearyl éter, polioxietileno-8-stearyl, polioxietileno-4-lauril éter, polioxietileno-35-laurilo éter y polioxietileno-23-lauril éter.

J. Polifosfaceno (PCPP)

Las formulaciones de PCPP se describen, por ejemplo, en Andrianov et al., "Preparation of hydrogel microspheres by coacervation of aqueous polyphosphazene solutions", *Biomaterials* (1998) 19(1-3):109-115 y Payne et al., "Protein Release from Polyphosphazene Matrices", *Adv. Drug. Delivery Review* (1998) 31(3):185-196.

K. Péptidos de muramilo

Ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-1-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP) y N-acetilmuramil-1-alanil-d-isoglutaminil-1-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforilo-xi)-etilamina MTP-PE).

L. Compuestos de imidazoquinolina

Ejemplos de compuestos de imidazoquinolina adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen el Imiquimod y sus análogos, descritos adicionalmente en Stanley, "Imiquimod and the imidazoquinolines: mechanism of action and therapeutic potential" *Clin Exp Dermatol* (2002) 27(7):571-577; Jones, "Resiquimod 3M", *Curr Opin Investig Drugs* (2003) 4(2):214-218; y las Patentes U.S. N° 4.689.338, 5.389.640, 5.268.376, 4.929.624,

5.266.575, 5.352.784, 5.494.916, 5.482.936, 5.346.905, 5.395.937, 5.238.944, y 5.525.612.

M. Compuestos de Tiosemicarbazona

5 Ejemplos de compuestos de tiosemicarbazona, así como los métodos de formulación, fabricación y cribado para compuestos todos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen los descritos en la WO04/60308. Las tiosemicarbazonas son particularmente efectivas en la estimulación de las células mononucleares sanguíneas periféricas humanas para la producción de citoquinas, como la TNF-*.

10 N. Compuestos de Tryptanthrin

15 Ejemplos de compuestos de de tryptanthrin, así como los métodos de formulación, fabricación y cribado para compuestos todos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen los descritos en la WO04/64759. Los compuestos de tryptanthrin son particularmente efectivos en la estimulación de las células mononucleares sanguíneas periféricas humanas para la producción de citoquinas, como la TNF-*.

20 La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, se pueden usar en la invención las siguientes composiciones de adyuvantes.

- (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua (WO99/11241);
- (2) una saponina (por ejemplo QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) (ver WO94/00153);
- (3) una saponina (por ejemplo QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) + un colesterol;
- 25 (4) una saponina (por ejemplo QS21) + 3dMPL +IL-12 (opcionalmente + un esterol) (WO98/57659);
- (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua (Ver las Solicitudes de Patente Europea 0835318, 0735898 y 0761231);
- (6) SAF, que contiene un 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero plurónico de bloque L121, y thr-MDP, ya sea microfluidizado en una emulsión submicrométrica o agitado en vórtice para generar una emulsión de tamaño de partículas mayor.
- 30 (7) Sistema de adyuvante Ribi™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene un 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo consistente de monofosforilípido A (MPL), trehalosa dimicolato (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (Detox™); y

35 Los inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen citoquinas, como interleucinas (por ejemplo, IL- 1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12, etc.), interferones (por ejemplo interferón-γ), factor estimulante de colonias de macrófagos, y factor de necrosis tumoral.

40 Las sales de aluminio y el MF59 son los adyuvantes preferidos para su uso con vacunas contra la gripe inyectables. Las toxinas bacterianas y los bioadhesivos son los adyuvantes preferidos para su uso con vacunas derivadas mucosalmente, como vacunas nasales.

45 KITS

Las composiciones descritas en la presente también se pueden proporcionar como kits, por ejemplo un kit que comprende un constructo auxiliar o línea celular de encapsidación como se describe en la presente. Uno o más de los componentes pueden ser secados por congelación y/o secados por aspersion para el envasado en el kit. Los componentes se pueden proporcionar como una única composición o se pueden proporcionar de forma separada. Además, los componentes pueden ser reconstituidos antes del uso de tal forma que sean adecuados para la administración mucosal. Los kits descritos en la presente pueden incluir además componentes adicionales como jeringuillas, soluciones de reconstitución, manuales de instrucciones y similares.

55 Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar más completamente la presente invención. Adicionalmente, estos ejemplos proporcionan realizaciones preferidas de la invención y no se pretende que limiten el ámbito de la misma. Además, la enumeración de intervalos de valores en la presente se pretende meramente que sirvan como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del rango, a menos que se indique de otra manera en la presente, cada valor individual está incorporado en la especificación como si se hubiese enumerado individualmente en la presente. Todos los métodos descritos en la presente pueden ser realizados en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga por el contexto de manera clara. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo "como") proporcionado en la presente se pretende meramente que ilustre mejor la invención y no supone una limitación en el ámbito de la invención reivindicada de otro modo. Ningún lenguaje en la especificación debería interpretarse como indicativo de un elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

65

Las agrupaciones de elementos o realizaciones alternativas de la invención divulgadas en la presente no deben ser consideradas como limitaciones. Cada miembro del grupo puede ser referido y reivindicado individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos encontrados en la presente. Se anticipa que uno o más miembros de un grupo pueden ser incluidos en, o eliminados en la especificación debe ser considerado como una indicación de cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

Las agrupaciones de elementos o realizaciones alternativas de la invención divulgadas en la presente no deben ser consideradas como limitaciones. Cada miembro del grupo puede ser referido y reivindicado individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos encontrados en la presente. Se anticipa que uno o más miembros de un grupo pueden ser incluidos en, o eliminados de, un grupo por razones de conveniencia y/o patentabilidad. Cuando tienen lugar dichas inclusiones o eliminaciones, la especificación se considera en la presente que tiene el grupo como se ha modificado cumpliendo así la descripción escrita de todos los grupos Markush usados en las reivindicaciones añadidas.

Las realizaciones preferidas de esta invención se describen en la presente, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Por supuesto, las variaciones de estas realizaciones preferidas se harán evidentes para los expertos en la técnica al leer la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos en la técnicas empleen dichas variaciones como es apropiado, y los inventores pretenden que la invención pueda ser puesta en práctica de otra forma distinta a la descrita específicamente en la presente. Por consiguiente, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia enumerados en las reivindicaciones añadidas a la misma como sea permitido por la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas las variaciones de la misma está abarcada por la invención a menos que se indique lo contrario en la presente o se contradiga claramente por el contexto.

EJEMPLO 1: PREPARACION DE UNA SECUENCIA DE AMPLIFICACION 5' MODIFICADA

La región 5' del ARN_{tasp} se alineó con la señal de encapsidación SIN putativa y se identificó una región de alta homología (Figura 2). en particular, la región definida por los nucleótidos 1029 a 1050 de la señal de encapsidación SIN putativa (descrita en ciertas referencias como nucleótidos 945-1076) mostró más de un 80% de homología (18 de 22 nucleótidos) con los residuos 37 a 59 de la secuencia de amplificación de ARN_{tasp}.

Usando el programa mfold (Zucker et al.), se predijo la estructura secundaria del ARN_{tasp} del tipo salvaje (Figuras 4A y 4B). Las mutaciones se introdujeron en la estructura del ARN_t contenido en los auxiliares tDH-HRcap (gen de la cápside de la cepa SIN HR insertada en la esqueleto de tDH, ver WO 02/099035) y tDH-VutrSGly (WO 02/099035; Perri et al. (2003) J Virol. 77(19):10394-403). Específicamente, las mutaciones se introdujeron dentro de la región de homología a la señal de encapsidación SIN por mutagénesis dirigida al sitio para cambiar la secuencia de nucleótidos primaria pero manteniendo la estructura secundaria general similar a la del ARN_{t_{ASP}} del tipo salvaje. Las secuencias 5' modificadas se muestran en la Figura 3 y los constructos auxiliares que contienen estas secuencias modificadas se llamaron tMOD-HRcap y tMOD-VutrSgly. Las secuencias de amplificación 5' modificadas se muestran en la Figura 3.

EJEMPLO 2: ENCPASIDACION DE PARTICULAS DE REPLICONES DE ALFAVIRUS USANDO CASETES ESTRUCTURALES CON SECUENCIAS DE AMPLIFICACION 5' MODIFICADAS

La secuencia de amplificación 5' modificada designada mod#1 se produjo como se describe en el Ejemplo 1 y se usó para encapsidar un vector de replicón que expresa GFP, esencialmente como se describe en Gardner et al. (2000) J. Virol 74(24):11849-11857.

Para probar la funcionalidad de los auxiliares modificados, se linealizaron el plásmido SINCR-GFP que codifica el replicón, los auxiliares con tanto el ARN_t del tipo salvaje o las secuencias modificadas con el enzima de restricción individual *PmeI* y el ARN se transcribió in vitro. El ARN del replicón se contransfectó junto con los ARNs auxiliares defectuosos que codifican la cápside de SIN y la glicoproteína de constructos como se describe en la tabla 1.

Las células transfectadas se incubaron a 34° C durante 24 horas, momento en el cual se recolectaron los sobrenadantes del cultivo, se clarificaron por centrifugación, se diluyeron en serie, y se usaron para infectar células BHK-21 nativas durante aproximadamente 14 horas. Usando análisis de citometría de flujo (FACS) se determinaron los títulos de las partículas. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

ARNs auxiliares		Título IU/ml
CAPSIDE	ENVOLTURA	
tDH-HRcap	tDH-VutrSGly	7.75E+07
tMOD-HRcap	tDH-VutrSGly	5.79E+07
tDH-HRcap	tMOD-VutrSGly	6.17E+06
tMOD-HRcap	tMOD-VutrSGly	5.15E+07

También se probaron las partículas para su infectividad y capacidad de producir partículas nuevas en el momento de la infección de células nativas, una medición de la co-encapsidación auxiliar defectuosa. A infección de MOI alta, las partículas producidas usando constructos que comprendían las secuencias de amplificación modificadas infectaron células nativas mucho más eficientemente que las partículas producidas usando constructos que comprendían las secuencias de amplificación no modificadas. Así, las partículas producidas usando casetes estructurales que comprendían las secuencias de amplificación 5' modificadas contenían menos partículas abortivas.

Además, como se muestra en las Figuras 4A y 4B, se evaluaron por FACS las partículas producidas usando casetes estructurales que comprenden las secuencias de amplificación 5' modificadas tienen al menos 10 veces menos células co-infectadas 16 horas después de la infección. Como se muestra en la Figura 6, el número de células infectadas con partículas preparadas con los auxiliares modificados aumenta a medida que aumenta el MOI, mientras que el número de células infectadas con partículas derivadas de auxiliares con un ARNt se estanca a MOI=1 relativamente bajo. Este resultado sugiere que las preparaciones de partículas derivadas de auxiliares con ARNt tienen un número alto de partículas abortivas compitiendo con las células infectadas, por lo tanto la infectividad medible (por ejemplo el porcentaje de células positivas GFP) se estanca antes. Por el contrario, las partículas derivadas con los auxiliares modificados tienen un número reducido de partículas abortivas y el número de células infectadas aumenta sobre un intervalo de M.O.I.s.

Así, usando los constructos auxiliares estructurales que comprenden secuencias de amplificación modificadas que son señales de encapsidación defectuosas reduce significativamente la co-encapsidación mientras que encapsida eficientemente partículas de replicones.

Reivindicaciones

- 5 **1.** Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de amplificación 5' modificada con una longitud de entre 10 y 150 nucleótidos, en donde la secuencia modificada proporciona un sitio de reconocimiento para la síntesis de ARN de alfavirus de cadena positiva pero no proporciona un sitio de reconocimiento para la encapsidación del ARN.
- 2.** El polinucleótido aislado de la reivindicación 1, en donde el polinucleótido es ARN.
- 10 **3.** El polinucleótido de la reivindicación 1, en donde la secuencia de amplificación 5' modificada comprende una secuencia que muestra al menos alrededor del 80% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NOs: 4-16.
- 15 **4.** El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en donde la secuencia de amplificación 5' modificada está derivada de una secuencia seleccionada del grupo consistente de una secuencia 5' de alfavirus nativa, una secuencia 5' de alfavirus DI no nativa, una secuencia viral no de alfavirus y una secuencia de ARN celular.
- 5.** El polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en donde la secuencia de amplificación modificada es sintética.
- 20 **6.** Un constructo de vector de ARN que comprende la secuencia de amplificación 5' de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 7.** El constructo de vector de la reivindicación 5, que comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un promotor de la región de unión de alfavirus, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus; y una secuencia de reconocimiento de polimerasa de ARN.
- 25 **8.** El constructo de vector de la reivindicación 7, que comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un marcador seleccionable.
- 30 **9.** El constructo de vector de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde el vector no codifica todas las proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas.
- 10.** El constructo de vector de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, donde las proteínas estructurales de alfavirus son las glicoproteínas E2 y E1.
- 35 **11.** El constructo de vector de la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en donde la proteína estructural de alfavirus es una proteína de la cápside.
- 12.** El constructo de vector de cualquiera de las reivindicaciones 6-11, en donde las secuencias están derivadas de más de un alfavirus.
- 40 **13.** Un constructo de vector de alfavirus, que comprende un promotor 5' ligado operativamente a una molécula de ácido nucleico, en donde dicha molécula de ácido nucleico es ADN complementario al vector de ARN de acuerdo con las reivindicaciones 6-12.
- 45 **14.** El constructo de vector de alfavirus de la reivindicación 13, que comprende además una secuencia 3' que controla la terminación de la transcripción.
- 50 **15.** El constructo de vector de alfavirus de la reivindicación 14, en donde el promotor 5' es un promotor eucariota.
- 16.** El constructo de vector de alfavirus de la reivindicación 14, en donde el promotor 5' es un promotor procariota.
- 55 **17.** Una célula que comprende un constructo de vector de alfavirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-16.
- 18.** Una línea celular de encapsidación de alfavirus, que comprende una célula huésped y uno o más vectores de alfavirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6-13.
- 60 **19.** Una célula auxiliar para producir una partícula de alfavirus defectuosa, infecciosa, que comprende en una célula permisiva de alfavirus:
 - un vector de replicón de alfavirus; y
 - uno o más constructos auxiliares separados que codifican la proteínas estructurales de alfavirus ausentes del vector de replicón, en donde al menos uno de los mencionados constructos auxiliares separados comprende una secuencia de amplificación 5' modificada de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5 y en donde
- 65

adicionalmente

la expresión combinada del vector de replicón y los vectores auxiliares separados produce una partícula de alfavirus ensamblada que comprende una o más secuencias heterólogas, es capaz de infectar una célula, y es incapaz de completar la replicación viral.

- 5
20. La célula auxiliar de acuerdo con la reivindicación 19, que comprende dos constructos auxiliares separados, en donde el primer constructo auxiliar codifica una proteína de la cápside de alfavirus y un segundo constructo codifica glicoproteínas de alfavirus.
- 10
21. La célula auxiliar de acuerdo con la reivindicación 19 o la reivindicación 20, en donde todos de los uno o más constructos auxiliares separados comprende una secuencia de amplificación 5' modificada.
- 15
22. La célula auxiliar de acuerdo con las reivindicaciones 19 a 21, en donde la mencionada célula auxiliar es transfectada con los vectores de replicones de alfavirus y el uno o más constructos auxiliares separados.
- 20
23. Un método para hacer partículas de alfavirus, defectuosas en replicación, infecciosas, que comprende:
- a. proporcionar una célula auxiliar de acuerdo con las reivindicaciones 19 a 22;
 - b. producir las partículas de alfavirus en la célula auxiliar; y
 - c. recolectar las partículas de alfavirus producidas de la célula auxiliar.
- 25
24. Una composición que comprende partículas de alfavirus, defectuosas en replicación, infecciosas producidas de acuerdo con el método de la reivindicación 23, en donde la composición está libre de partículas de alfavirus competentes en replicación detectables.
- 30
25. Una formulación farmacéutica que comprende partículas de alfavirus, defectuosas en replicación, infecciosas producidas por el método de la reivindicación 23 en un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35
26. Un método para hacer una secuencia de amplificación 5' modificada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende los pasos de
- a. determinar regiones de homología de secuencia entre una secuencia de amplificación 5' conocida y una secuencia que contiene una señal de encapsidación viral; y
 - b. alterar la secuencia primaria de la secuencia de amplificación 5' conocida de tal forma que la homología con la secuencia que contiene la señal de encapsidación viral se reduce pero la función de amplificación se mantiene, haciendo de este modo una secuencia de amplificación 5' modificada.
- 40
27. El método de la reivindicación 26, en donde la secuencia de amplificación 5' modificada es seleccionada del grupo consistente de una secuencia 5' de alfavirus nativa, un extremo 5' de alfavirus DI no nativo, una secuencia viral no de alfavirus y una secuencia de ARN celular.

45

50

55

60

65

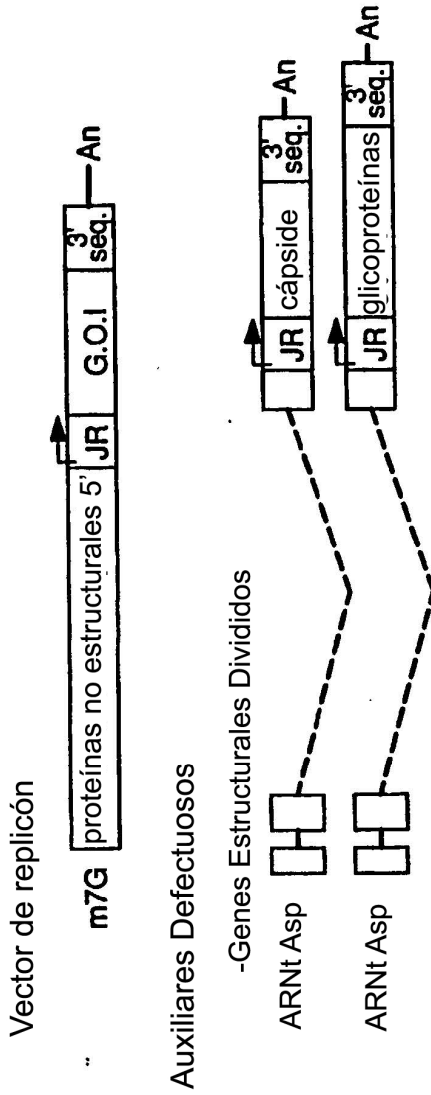


FIG. 1

(SEQ ID NO:1) señal de encapsidación SIN (945-1076) (51) CTTCTTGGCTATGCRAAAGTACTGACACAGTAAA--GGAGAACGGGTATCG-TTCCCTGTGTGCACGTA
 (SEQ ID NO:2) secuencias de ARNt (1) ATGGATATAGTGGTGGATATCCCGGCTGTACCGGGAGACCCGGGTTCGGTTCCCGACGGGAGC-
 (SEQ ID NO:3) Consenso (51) T T TG AGT C C GT A GGAGA CGGG TCG TTCCC G G

FIG. 2

unmod: ATGGATATAGTGGTGAGTATCCCCCGCTGTACGGGGAGACGGGGTTCGGTTC¹CCCCGACGGGGAGC (SEQ ID NO:2)
 mod#1: ATGGATATAGTGGTGAGTATCCCCCGCTGTACGGCCCA²CGGAGGGTTCGGTTCGGGGACGGGGAGC (SEQ ID NO:4)
 mod#2: ATGGATATAGTGGTGAGTATCCCCCGCTGTACGGCCGCA³GGCTGGGGTTCAGCTCGCGGACGGGGAGC (SEQ ID NO:5)
 mod#3: ATGGATATAGTGGTGAGTATCCCCCGCTGTACGGCCGAG⁴GGTTCGACTCCCGCAGCGGGGAGC (SEQ ID NO:6)
 mod#4: ATGGATATAGTGGTGAGTATCCCCCGCTGTACGGCCGAG⁵CAAGCGGGTTCGTCTCCCGCAGCGGGGAGC (SEQ ID NO:7)
 mod#5: ATGGATATAGTGGTGAGTATCCCCCGCTGTACGGCCGAG⁶GGTTCGACTCGCCGACGGGGAGC (SEQ ID NO:8)
 mod#6: ATGGATATAGTGGTGAGTATCCCCCGCTGTACGGCCGAG⁷GGTTCAGCTCCGGACGGGGAGC (SEQ ID NO:9)
 mod#7: ATGGATATAGTGGTGAGTATCCCCCGCTGTACGGCCGAG⁸GGTTCAGGTCGGGACGGGGAGC (SEQ ID NO:10)
 mod#8: ATGGATATAGTGGTGAGTATCCCCCGCTGTACGGCCGAG⁹GGTTCCTCGGGACGGGGAGC (SEQ ID NO:11)
 mod#9: ATGGATATAGTGGTGAGTATCCCCCGCTGTACGGCCGAG¹⁰GGTTCCTGTCGGGACGGGGAGC (SEQ ID NO:12)
 mod#10: ATGGATATAGTGGTGAGTATCCCCCGCTGTACGGCCGAG¹¹GGTTC¹²TGGTCGGGACGGGGAGC (SEQ ID NO:13)
 mod#11: ATGGATATAGTGGTGAGTATCCCCCGCTGTACGGCCGAG¹³GGTTCACCTCGGGACGGGGAGC (SEQ ID NO:14)
 mod#12: ATGGATATAGTGGTGAGTATCCCCCGCTGTACGGCCGAG¹⁴GGTTCAGCTCGGGGACGGGGAGC (SEQ ID NO:15)
 mod#13: ATGGATATAGTGGTGAGTATCCCCCGCTGTACGGCCGAG¹⁵GGTTCGTCTCGGGGACGGGGAGC (SEQ ID NO:16)

FIG. 3

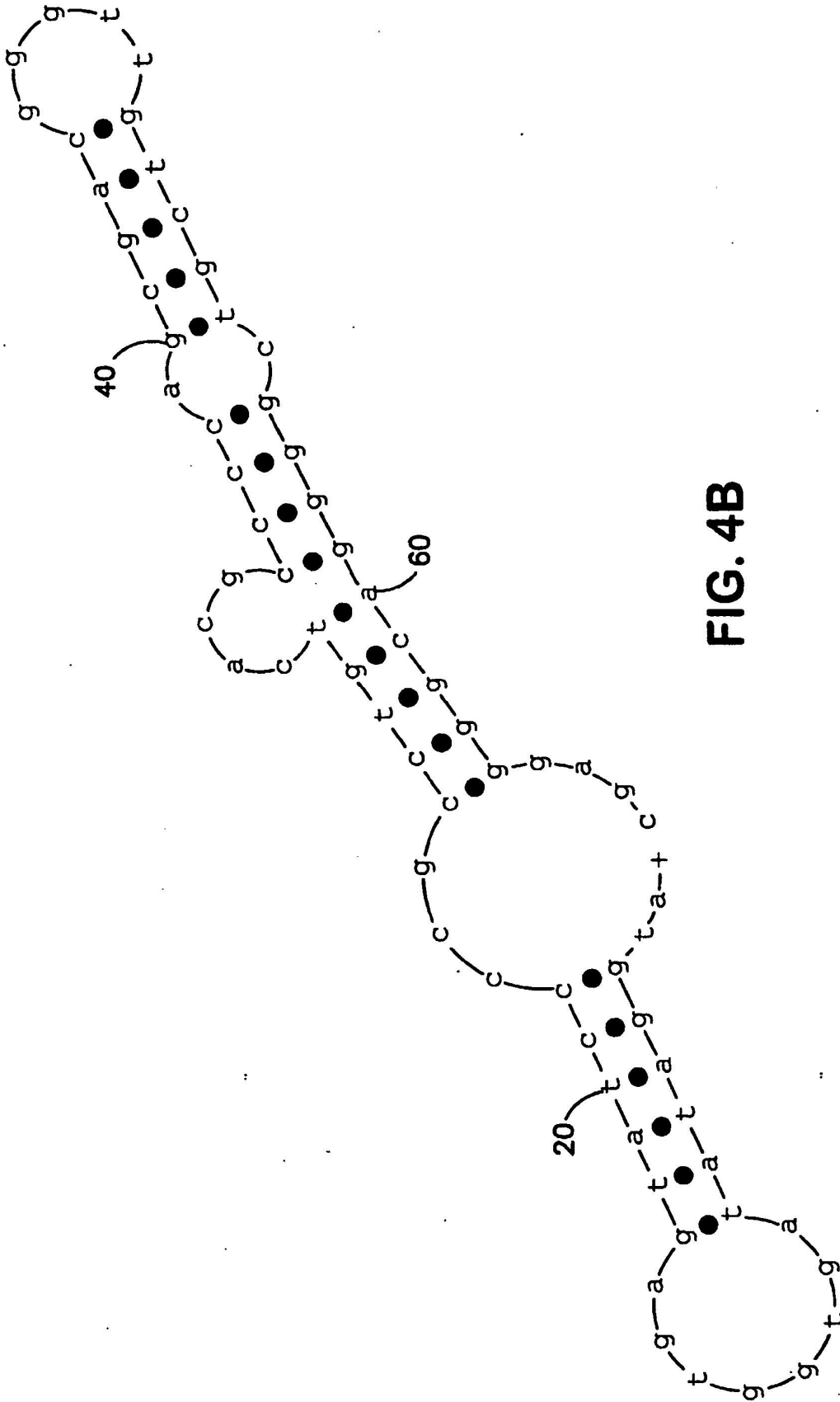


FIG. 4B

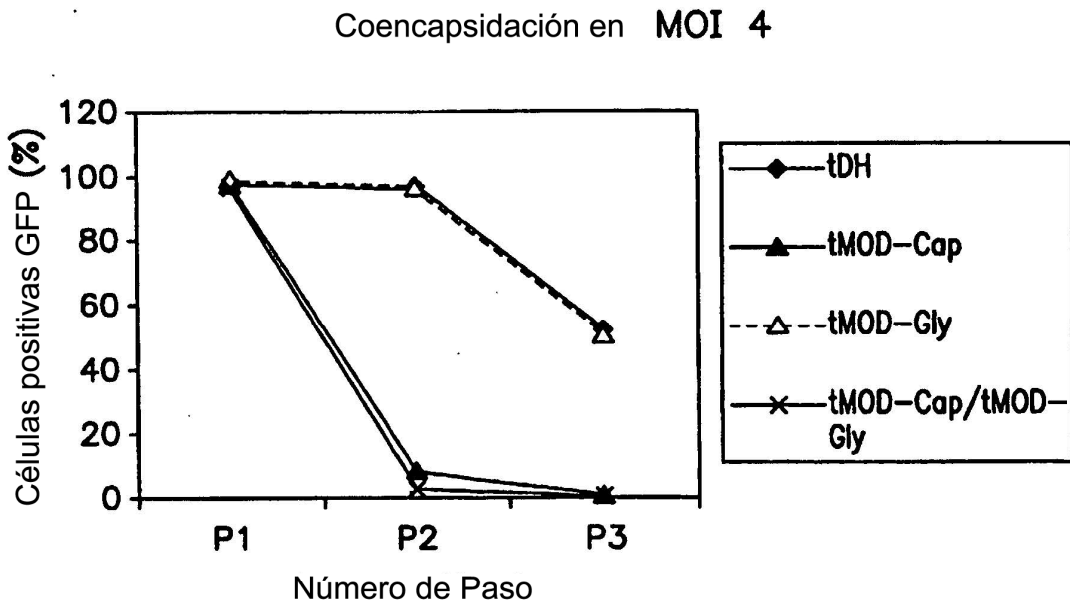
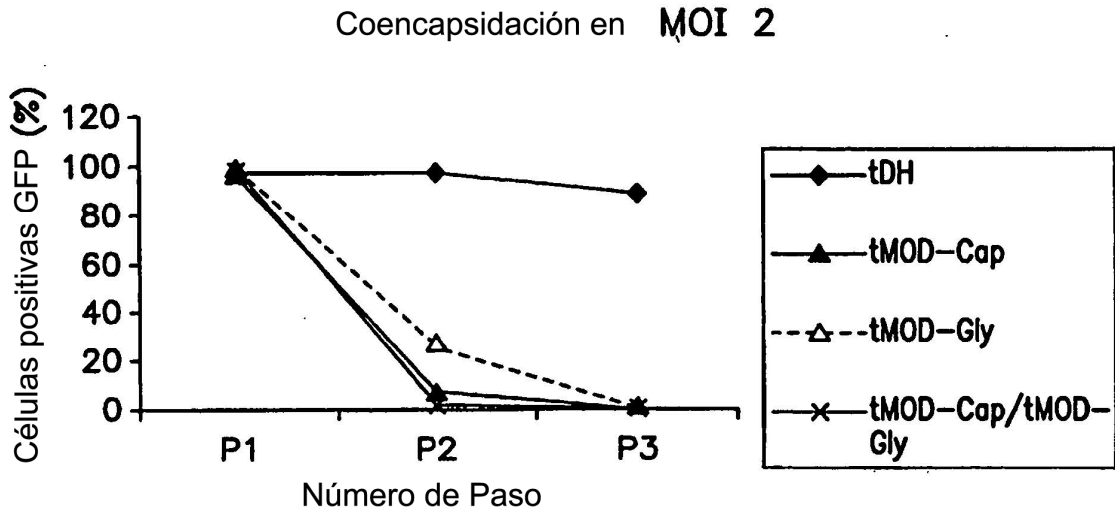


FIG. 5

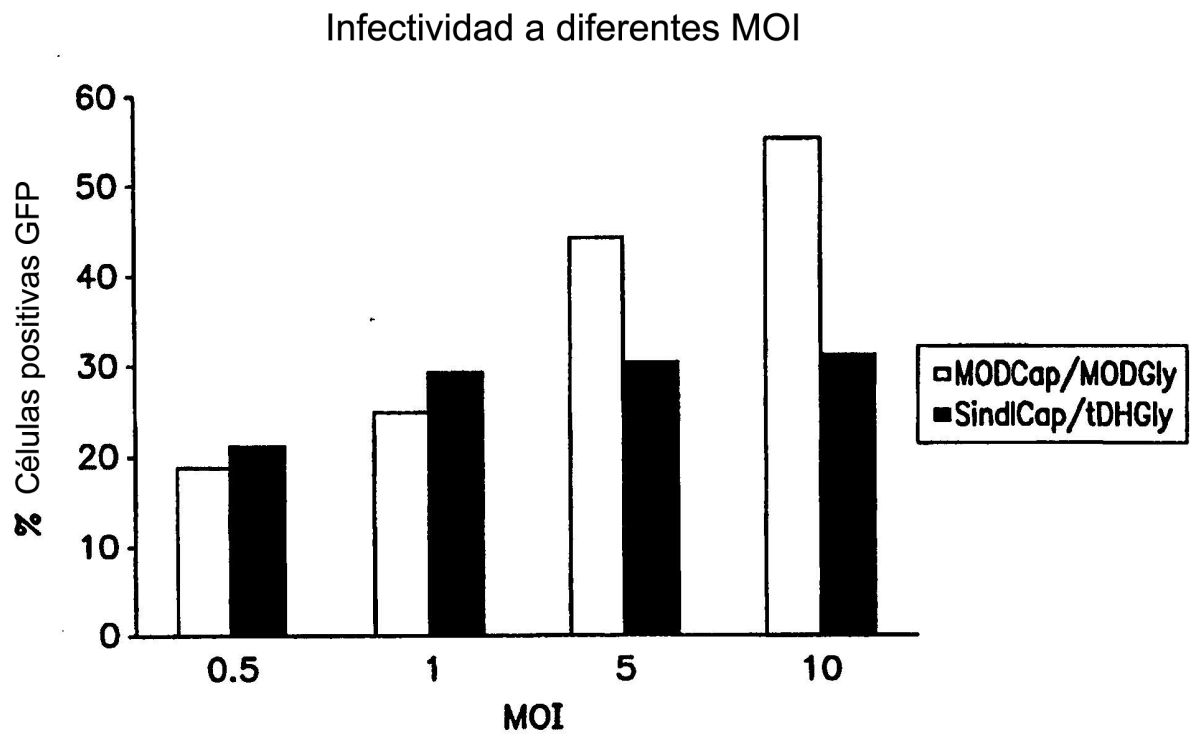


FIG. 6