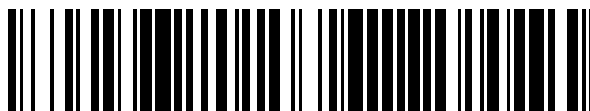


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 687**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2003 E 03813433 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 1590451**

54 Título: **Partículas alfavíricas y métodos de preparación**

30 Prioridad:

13.12.2002 US 433058 P

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

01.12.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SMITH, JONATHAN, F.;
KAMRUD, KURT;
DRYGA, SERGEY;
ALTERSON, HAROLD;
RAYNER, JON;
ALTERSON, KIM y
MAUGHAN, MAUREEN, F.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 552 687 T3

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

DESCRIPCIÓN

Partículas alfavíricas y métodos de preparación

Antecedentes de la invención

- 5 La presente invención se refiere a la tecnología de ADN recombinante, y en particular a introducir un ácido o ácidos nucleicos ajenos en una célula eucariótica, y más particularmente a métodos para producir partículas víricas o partículas de tipo virus infecciosas con altos rendimientos, especialmente partículas útiles en inmunoterapias y/o aplicaciones de terapia génica. En particular, la presente invención da a conocer un proceso comercialmente factible de alto rendimiento compatible con las NCF para producir preparaciones de partícula de replicón alfavírico (ARP en inglés) altamente purificadas adecuadas para uso en medicina humana y veterinaria.
- 10 El género de los alfavirus incluye una variedad de virus, todos los cuales son miembros de la familia de los *Togaviridae*. Los alfavirus incluyen virus de la encefalitis equina oriental (EEE), virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), virus de Everglades, virus de Mucambo, virus de Pixuna, virus de la encefalitis equina occidental (WEE), virus de Sindbis, virus del bosque Semliki, virus de Middleburg, virus de chikunguña, virus de O'nyong-nyong, virus del río Ross, virus del bosque Barmah, virus de Getah, virus de Sagiyama, virus de Bebaru, virus de Mayaro, virus de Una, virus de Aurá, virus de Whataroa, virus de Babanki, virus de Kyzylgach, virus J de las Highlands, virus de Fort Morgan, virus de Ndumu y virus de Buggy Creek. El genoma vírico es un ARN monocatenario de sentido mensajero modificado en el extremo 5' con una caperuza metilada y en el extremo 3' con un tramo de poli(A) de longitud variable. Las unidades estructurales que contienen una única proteína vírica, la cápsida, se asocian con el genoma de ARN en una nucleocápsida icosaédrica. En el virión, la cápsida está rodeada de una cubierta lipídica cubierta con una disposición regular de picos de proteína de membrana, cada uno de los cuales consiste en un complejo heterodimérico de dos glicoproteínas, E1 y E2. Véase Pedersen *et al.*, *J. Virol.* 14: 40 (1974). Los virus de Sindbis y del bosque Semliki se consideran los alfavirus prototípicos y se han estudiado extensamente. Véase Schlesinger, "The Togaviridae and Flaviviridae", Plenum Publishing Corp., Nueva York (1986). El virus VEE se ha estudiado extensamente, véase, p.ej. la patente de EE.UU. n° 5.185.440.
- 25 Los estudios de estos virus han conducido al desarrollo de técnicas para vacunación contra las enfermedades alfavíricas y contra otras enfermedades mediante el uso de vectores alfavíricos para la introducción de genes ajenos. Véanse la patente de EE.UU. n° 5.185.440 de Davis *et al.* y la publicación PCT WO 92/10578. El uso de los vectores alfavíricos para dirigir la expresión de genes ajenos en eucariotas se ha vuelto un tema de creciente interés. Es bien conocido que las vacunas víricas vivas atenuadas están entre los medios más exitosos de control de enfermedades víricas. Sin embargo, para algunos patógenos víricos, la inmunización con una cepa de virus vivo puede ser impracticable o insegura. Una estrategia alternativa es la inserción de secuencias que codifican antígenos inmunizantes de dichos agentes en una cepa viva replicante de otro virus. Uno de dichos sistemas que utiliza un vector VEE vivo se describe en las patentes de EE.UU. n° 5.505.947 y 5.643.576 de Johnston *et al.* Se describe otro de dichos sistemas por Hahn *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2679-2683 (1992), en el que constructos del virus de Sindbis expresan una forma truncada de proteína hemaglutinina de la gripe. Es otro sistema el sistema de replicón alfavírico, como se describe en la patente de EE.UU. n° 6.190.666 de Garoff *et al.*, las patentes de EE.UU. n° 5.792.462 y 6.156.558 de Johnston *et al.*, las patentes de EE.UU. n° 5.814.482, 5.843.723, 5.789.245, 6.015.694, 6.105.686 y 6.376.236 de Dubensky *et al.*; la solicitud publicada de EE.UU. n° 2002-0015945 A1 (Polo *et al.*), la solicitud publicada de EE.UU. n° 2001-0016199 (Johnston *et al.*), Frolov *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 11371-11377 y Pushko *et al.* (1997) *Virology* 239: 389-401.

Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad en la técnica de métodos que permitan la producción de partículas alfavíricas infecciosas altamente inmunogénicas y derivados de las mismas con alta pureza y alto rendimiento, especialmente para uso en preparaciones de vacuna de alta pureza.

Sumario de la invención

- 45 La presente invención proporciona proceso comercialmente factible de alto rendimiento compatible con las NCF para producir partículas de replicón alfavírico (ARP) altamente purificado o preparaciones víricas adecuadas para uso en medicina humana y veterinaria. La presente invención es también aplicable a la producción de vacunas alfavíricas atenuadas vivas y a composiciones inmunogénicas que contienen las mismas, pudiendo dichos alfavirus atenuados portar o no genes heterólogos para expresión en la vacuna, como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.643.576.
- 50 El método de la presente invención para preparar partículas de replicón alfavírico (ARP) portadoras de mutaciones que confieren capacidad de unión a glicosaminoglicano en células hospedadoras de mamífero comprende las etapas de (a) introducir un ácido nucleico de replicón alfavírico (o un ácido nucleico alfavírico) en una célula hospedadora permisiva de alfavirus, en la que dicho ácido nucleico de replicón contiene al menos una señal de empaquetamiento en alfavirus y al menos una secuencia de codificación de un gen o genes de interés expresables en dicho ácido nucleico de replicón alfavírico, en la que la célula hospedadora comprende al menos una función colaboradora, produciendo una célula hospedadora modificada; (b) cultivar dicha célula hospedadora modificada en un medio en condiciones que permitan la expresión de al menos una función colaboradora y que permitan la replicación del ácido nucleico de replicón alfavírico y empaquetar entonces el ácido nucleico de replicón alfavírico formando ARP; (c) poner en contacto las células hospedadoras modificadas con una solución de lavado salina

acuosa que tiene una fuerza iónica de 0,5 a 5 M (en la presente memoria el “medio de liberación”) para liberar las ARP en la disolución acuosa, produciendo una disolución que contiene ARP y (d) recoger las ARP de la disolución que contiene ARP de la etapa (c), seguido de cromatografía de afinidad con heparina. Puede conseguirse la fuerza iónica del medio de liberación usando sales que no inactiven los viriones o ARP, y las sales adecuadas incluyen, pero sin limitación, cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de amonio, acetato de amonio, cloruro de potasio, cloruro de calcio y bicarbonato de amonio. Ventajosamente, el medio de liberación (lavado salino) comprende un tampón con un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, deseablemente de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5. Cuando las células no se separan del medio, puede elevarse la fuerza iónica del medio mediante la adición de una sal sólida o una disolución salina concentrada, proporcionando la fuerza iónica aumentada para liberar las ARP (o viriones) de las células. El lavado salino de las células productoras con medio de liberación parece mejorar la recuperación de ARP, especialmente cuando hay cargas superficiales particulares en la superficie de las ARP; en el caso de VEE, los residuos aminoacídicos en E2-209 y/o E2-120 parecen proporcionar buenos sitios para introducir una carga positiva. Las sustituciones aminoacídicas que dan como resultado cambios de carga en ciertos mutantes de virus atenuados mejoran la recuperación con lavado salino de ARP. El fosfato de sodio 16 mM, NaCl 0,5 M, es un medio de liberación ejemplar usado en el lavado salino.

Las ARP o partículas víricas se producen en una célula que permita el empaquetamiento del ácido nucleico del virus o replicón en partículas infecciosas, concretamente en una célula permisiva de alfavirus. El vector de ARN de replicón alfavírico (o ácido nucleico de replicón) puede derivar de VEE, virus de Sindbis, particularmente TR339, arbovirus sudafricano nº 86 y virus del bosque Semliki entre otros. Cuando se usa un ácido nucleico de replicón, las funciones de empaquetamiento están presentes en la célula en que se producen las partículas, por un ácido o ácidos nucleicos introducidos en la célula en trans o ya presentes en la célula. Para algunos vectores de replicón alfavírico con ciertas secuencias de codificación heterólogas, los presentes inventores han observado que aumentar la relación de ácido nucleico colaborador de glicoproteína alfavírica mejora el empaquetamiento y/o rendimiento de ARP.

Ventajosamente, la célula en que se producen las ARP es una célula de mamífero cultivada, pero son especialmente útiles células Vero, células de riñón de hámster recién nacido (BHK), fibroblastos de embrión de pollo (CEF), DF-1, 293, 293T, células de ovario de hámster chino (CHO) y células de insecto cultivadas. Las células de insecto cultivadas adecuadas disponibles incluyen, sin limitación, células SF21, *Spodoptera frugiperda*; C6/36, *Aedes albopictus*; TRA-171, *Toxorhynchites amboinensis*; RML-12, *Aedes aegypti*; AP-61, *Aedes pseudoscutellaris* y MOS-55, *Anopheles gambiae*.

Ventajosamente, las células en que se van a producir las ARP se sincronizan en la fase G2/M del ciclo celular antes de electroporación con el ácido o ácidos nucleicos de vector de replicación alfavírico y colaborador. Sin desear ligarse a teoría particular alguna, se cree que la mayor eficacia de electroporación y transferencia de ácido nucleico al núcleo (en aquellas realizaciones de la invención que implican actividad nuclear) de la célula electroporada se consigue en dichas células en fase G2/M.

El ácido nucleico de replicón alfavírico puede comprender una secuencia nucleotídica de interés para expresar en la célula hospedadora. La secuencia nucleotídica puede codificar un polipéptido inmunogénico, una citocina o una proteína terapéutica, entre otros, o la secuencia nucleotídica puede transcribirse a la célula hospedadora produciendo un ARN funcional, tal como una ribozima, una molécula interferente o anticodificante. Si se usa un ácido nucleico alfavírico, puede ser un virus de tipo silvestre, un virus recombinante que comprende una secuencia nucleotídica de interés como se describe anteriormente o puede ser un virus atenuado útil para producir una respuesta inmunogénica en el hospedador.

Cuando se introducen el ácido o ácidos nucleicos de replicón vírico y/o colaborador por electroporación, es especialmente eficaz electroporar las células cuando las células están presentes a una concentración de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^9 células por ml, deseablemente de aproximadamente 5×10^7 a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ por ml de medio de electroporación, en presencia de suficiente ácido o ácidos nucleicos de replicón y colaborador para permitir un empaquetamiento eficaz. La molécula o moléculas de ARN colaborador no tienen que tener caperuza.

Después de introducir el ácido nucleico en las células en que se producirán las ARP, se disponen las células en recipientes de cultivo que contienen medio de crecimiento. Para aquellas células que crecen mejor como células adheridas, el recipiente comprende suficiente medio de crecimiento para permitir el crecimiento, replicación de ARN de replicón, expresión de proteína de empaquetamiento y producción de partícula de replicón vírico, y suficiente área superficial para que estas células se adhieran y crezcan. La superficie puede ser paredes de recipiente, matraz o placa, o pueden disponerse en el recipiente fibras huecas, perlas u otros microportadores de material apropiado para el crecimiento de células adheridas. Las células Vero u otras células crecidas sobre microportadores (perlas o discos) pueden electroporarse exitosamente en los portadores y cultivarse, produciendo ARP a niveles comparables a los conseguidos con células no adheridas. Son también útiles las cámaras de crecimiento de fibra hueca o “Cell cubes”. Después de que las células hayan crecido y producido partículas, típicamente de aproximadamente 12 a aproximadamente 48 horas, se recolectan las partículas. Las células pueden separarse del medio de crecimiento, preferiblemente prelavarse para retirar los desechos celulares y materiales externos y lavarse entonces con un pequeño volumen de medio de liberación, con el resultado de que se liberan las ARP de las células y/o desechos

celulares y pueden recuperarse en una disolución purificada concentrada. Las partículas se purifican adicionalmente usando cromatografía de afinidad con heparina.

Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 muestra la generación de ARP usando ARN colaboradores con caperuza (barra izquierda de cada par) y ARN colaboradores sin caperuza (barra derecha de cada par) en diferentes tipos de células cultivadas. Se electroporaron las células con ARN de replicón con caperuza y moléculas de ARN colaborador con caperuza o sin caperuza. Se recogieron las ARP de los sobrenadantes de cultivo 24 después de la electroporación y se titularon en células Vero recientes.

10 La Figura 2 muestra el efecto del medio de crecimiento después de electroporación sobre el rendimiento de ARP. Los resultados se dan como título en el medio de cultivo, título en el lavado de NaCl 1 M de las células sedimentadas y título total (medio más lavado).

La Figura 3 muestra los efectos del pH del medio de crecimiento sobre el rendimiento de ARP. Se electroporaron células Vero usando un electrodo de placa Petri y se inocularon en matraces con medios de crecimiento completo ajustados a los valores de pH especificados.

15 La Figura 4 muestra el efecto de las diferentes disoluciones de lavado celular usadas justo antes de la elución de las ARP con el medio de liberación; se dan los detalles en el Ejemplo 7 a continuación en la presente memoria.

La Figura 5 muestra el efecto de usar diferentes composiciones de sal en el medio de liberación sobre el rendimiento de ARP. Las concentraciones y valores de pH de diversos medios de liberación son como se muestran.

20 La Figura 6 muestra el rendimiento de ARP usando un intervalo de concentraciones de NaCl en el medio de liberación.

Descripción detallada de la invención

Se proporcionan la siguiente discusión y definiciones para mejorar la claridad de la presente divulgación para un especialista en la técnica relevante.

25 En el contexto de la presente solicitud, nm significa nanómetro, ml significa milímetro, VEE significa virus de la encefalitis equina venezolana, EMC significa virus de la encefalomiocarditis, BHK significa células de riñón de hámster recién nacido, HA significa gen de hemaglutinina, GFP significa gen de proteína fluorescente verde, N significa nucleocápsida, FACS significa clasificador celular activado por fluorescencia, IRES significa sitio de entrada de ribosoma interno, ufp significa unidades formadoras de placa, ui significa unidades infecciosas y FBS significa suero bovino fetal. La expresión "aminoácido de E2 número (p.ej. Lys, Thr, etc.)" indica el aminoácido designado en el residuo designado de la proteína E2, y se usa también para hacer referencia a aminoácidos en residuos específicos en las proteínas E3 o E1.

30 Como se usa en la presente memoria, el término "alfavirus" tiene su significado convencional en la técnica, e incluye las diversas especies tales como virus VEE, virus del bosque Semliki (SFV), virus de Sindbis, virus del río Ross, virus de la encefalitis equina occidental, virus de la encefalitis equina oriental, virus de chikunguña, S.A. AR86, virus de Everglades, virus de Mucambo, virus del bosque Barmah, virus de Middelburg, virus de Pixuna, virus de O'nyong-nyong, virus de Getah, virus de Sagiyama, virus de Bebaru, virus de Mayaro, virus de Una, virus de Aurá, virus de Whataroa, virus de Banbanki, virus de Kyzylgach, virus J de las Highlands, virus de Fort Morgan, virus de Ndumu y virus de Buggy Creek. Los alfavirus preferidos usados en los constructos y métodos de la invención reivindicada son VEE, S.A. AR86, Sindbis (p.ej. TR339, véase la patente de EE.UU. n° 6.008.035) y SFV.

35 Los términos "secuencia de reconocimiento de replicación alfavírica 5'" y "secuencia de reconocimiento de replicación alfavírica 3'" hacen referencia a secuencias encontradas en alfavirus, o secuencias derivadas de las mismos, que se reconocen por las proteínas replicasa alfavíricas no estructurales y conducen a la replicación de ARN vírico. A veces se hace referencia a estas como los extremos 5' y 3' o las secuencias 5' y 3' alfavíricas. En los constructos descritos en la presente memoria, el uso de estos extremos 5' y 3' dará como resultado la replicación de la secuencia de ARN codificada entre los dos extremos. La secuencia de reconocimiento de replicación alfavírica 3' como se encuentra en alfavirus es típicamente de aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, y contiene una secuencia de reconocimiento de replicación 3' mínima mejor definida. La secuencia de reconocimiento de replicación 3' mínima, conservada entre alfavirus, es una secuencia de 19 nucleótidos (Hill *et al.*, J. Virology, 2693-2704, 1997). Estas secuencias pueden modificarse mediante técnicas biológicas estándares para minimizar adicionalmente el potencial de recombinación o introducir sitios de clonación, con la condición de que deben reconocerse por la maquinaria de replicación alfavírica.

40 El término "secuencia de reconocimiento de replicación alfavírica 5' mínima" hace referencia a la secuencia mínima que permite el reconocimiento por las proteínas no estructurales del alfavirus, pero que no da como resultado un empaquetamiento/recombinación significativos de las moléculas de ARN que contienen la secuencia. En una realización preferida, la secuencia de reconocimiento de replicación alfavírica 5' mínima da como resultado una

disminución de 50 a 100 veces de la frecuencia observada de empaquetamiento/recombinación del ARN que contiene esa secuencia. Puede valorarse el empaquetamiento/recombinación de colaboradores mediante varios métodos, p.ej. el método descrito por Lu y Silver (J. Virol. Methods 2001, 91(1): 59-65).

5 Los términos “replicón de ARN alfavírico”, “ARN de replicón alfavírico”, “replicón de vector de ARN alfavírico” y “ARN de replicón de vector” se usan intercambiamente para hacer referencia a una molécula de ARN que expresa genes de proteína no estructural de tal modo que puede dirigir su propia replicación (amplificación) y que comprende, como mínimo, secuencias de reconocimiento de replicación alfavírica 5' y 3' (que pueden ser las secuencias mínimas, como se definen anteriormente, pero pueden ser como alternativa las regiones enteras del alfavirus), secuencias de codificación de proteínas no estructurales alfavíricas y un tramo de poliadenilación. Puede contener adicionalmente un promotor o IRES. Puede genomanipularse también para expresar proteínas estructurales alfavíricas. Johnston *et al.* y Polo *et al.* (citado en los antecedentes) describen numerosos constructos de dichos replicones de ARN alfavírico. Las realizaciones específicas de replicones de ARN alfavírico utilizados en la invención reivindicada pueden contener una o más mutaciones atenuantes, siendo una mutación atenuante una delección, adición o sustitución nucleotídica de uno o más nucleótidos o una mutación que comprende una redispersión o construcción quimérica que da como resultado la pérdida de virulencia en un virus vivo que contiene la mutación, en comparación con el alfavirus de tipo silvestre apropiado. Los ejemplos de sustitución nucleotídica atenuante (que da como resultado un cambio aminoacídico en el replicón) incluyen una mutación en la posición aminoacídica 538 de nsP1, la posición aminoacídica 96 de nsP2, o la posición aminoacídica 372 de nsP2 en el alfavirus S.A. AR86, y es un ejemplo de una mutación atenuante en la región de no codificación del ácido nucleico de replicón la sustitución de A o C en el nucleótido 3 de VEE.

15 Los términos “proteína o proteínas estructurales alfavíricas” hacen referencia a una o una combinación de proteínas estructurales codificadas por alfavirus. Estas se producen por los virus como una poliproteína y se representan generalmente en la bibliografía como C-E3-E2-6k-E1. E3 y 6k sirven como señales de translocación/transporte de membrana para las dos glicoproteínas E2 y E1. Por tanto, el uso del término E1 en la presente memoria puede hacer referencia a E1, E3-E1, 6k-E1 o E3-6k-E1, y el uso del término E2 en la presente memoria puede hacer referencia a E2, E3-E2, 6k-E2 o E3-6k-E2. Pueden introducirse mutaciones atenuantes en una cualquiera o más de las proteínas estructurales alfavíricas.

El término “colaborador o colaboradores” hace referencia a una molécula de ácido nucleico que es capaz de expresar una o más proteínas estructurales alfavíricas.

30 Los términos “célula colaboradora” y “célula de empaquetamiento” se usan intercambiamente en la presente memoria y hacen referencia a la célula en que se producen las partículas de replicón alfavírico. La célula colaboradora comprende un conjunto de colaboradores que codifican una o más proteínas estructurales alfavíricas. Como se da a conocer en la presente memoria, los colaboradores pueden ser ARN o ADN. La célula puede ser cualquier célula que sea permisiva de alfavirus, concretamente células que sean capaces de producir partículas alfavíricas tras la introducción de un transcrito de ARN vírico. Las células permisivas de alfavirus incluyen, pero sin limitación, células Vero, de riñón de hámster recién nacido (BHK), 293, 293T, fibroblastos de embrión de pollo (CEF) y de ovario de hámster chino (CHO). En ciertas realizaciones de la invención reivindicada, la célula colaboradora o de empaquetamiento puede incluir adicionalmente una ARN polimerasa dependiente de ARN heterólogo y/o una proteína específica de secuencia.

40 Los términos “partículas de replicón alfavírico”, “partículas de replicón vírico” o “partículas alfavíricas recombinantes”, usados intercambiamente en la presente memoria, significan un complejo estructural de tipo virión que incorpora un ARN de replicón alfavírico que expresa una o más secuencias de ARN heterólogo. Típicamente, el complejo estructural de tipo virión incluye una o más proteínas estructurales alfavíricas embebidas en una cubierta lipídica que encierra una nucleocápsida que, a su vez, encierra el ARN. La cubierta lipídica deriva típicamente de la membrana plasmática de la célula en que se producen las partículas. Preferiblemente, el ARN de replicón alfavírico está rodeado por una estructura de nucleocápsida que comprende la proteína de cápsida alfavírica, y las glicoproteínas alfavíricas están embebidas en la cubierta lipídica derivada de célula. Las proteínas estructurales y ARN de replicón pueden derivar del mismo o diferentes alfavirus. En una realización específica, el ARN de replicón deriva de VEE y las proteínas estructurales derivan del virus de Sindbis (véase, p.ej., Dubensky *et al.*, patente de EE.UU. nº 6.376.236). Las partículas de replicón alfavírico son infecciosas pero defectivas de propagación, concretamente, el ARN de replicón no puede propagarse más allá de la célula hospedadora en que se infectan inicialmente las partículas en ausencia del ácido o ácidos nucleicos colaboradores que codifican las proteínas estructurales alfavíricas.

55 Los “constructos colaboradores”, concretamente moléculas de ADN recombinante que expresan las proteínas estructurales alfavíricas, pueden generarse a partir de un único colaborador que se resuelve en dos moléculas separadas *in vivo*. Por tanto, se conserva la ventaja de usar un único colaborador en términos de facilidad de fabricación y eficacia de producción, mientras que se adquieren las ventajas de un sistema colaborador bipartito en ausencia de empleo de un sistema de expresión bipartito. Puede usarse un constructo colaborador de ADN mientras que en un segundo conjunto se usa un vector colaborador de ARN. En el caso de constructos colaboradores de ADN que no empleen señales de reconocimiento alfavíricas para replicación y transcripción, la frecuencia teórica de recombinación es menor que en los sistemas colaboradores de ARN bipartitos que emplean dichas señales.

Se emplea un promotor para dirigir la transcripción de ARN a partir de ADN, concretamente una ARN polimerasa dependiente de ADN, para producir el replicón alfavírico y los ácidos nucleicos colaboradores descritos en la presente memoria. En el presente contexto, un promotor es una secuencia de nucleótidos reconocida por una polimerasa y suficiente para causar la transcripción de una secuencia asociada (en dirección 3'). El promotor puede ser constitutivo (véase a continuación). Como alternativa, el promotor puede estar regulado, concretamente actuando no constitutivamente para causar la transcripción de la secuencia asociada. Si es inducible, hay secuencias presentes que median la regulación de la expresión de modo que la secuencia asociada se transcriba solo cuando (i) está presente una molécula inductora en el medio en o sobre el que se cultivan las células, o (ii) se cambian las condiciones a las que están expuestas las células para ser condiciones inductoras. En el presente contexto, una secuencia reguladora de la transcripción incluye una secuencia promotora y puede incluir adicionalmente secuencias activas en cis para la expresión regulada de una secuencia asociada en respuesta a señales ambientales.

En las realizaciones de colaborador de ARN y para producir el ARN de replicón, se utiliza el promotor para sintetizar ARN en una reacción de transcripción *in vitro*, y los promotores específicos adecuados para este uso incluyen los promotores de ARN polimerasa SP6, T7 y T3. En las realizaciones de colaborador de ADN, el promotor funciona en una célula dirigiendo la transcripción de ARN. Los promotores potenciales para la transcripción *in vivo* del constructo incluyen promotores eucarióticos tales como promotores de ARN polimerasa II, promotores de ARN polimerasa III o promotores víricos tales como LTR de MMTV y MoSV, la región temprana de SV40, RSV o CMV. Están disponibles en la materia muchos otros promotores de mamífero y víricos adecuados. Como alternativa, pueden emplearse promotores de ARN polimerasa dependientes de ADN de bacterias o bacteriófagos, p.ej., SP6, T7 y T3, para uso *in vivo*, proporcionándose a la célula la ARN polimerasa coincidente mediante un plásmido, vector de ARN o vector vírico separado. En una realización específica, la ARN polimerasa coincidente puede transformarse establemente en una estirpe celular colaboradora bajo el control de un promotor inducible.

Los constructos de ADN que funcionan en una célula pueden funcionar como plásmidos autónomos transfectados en la célula o pueden transformarse establemente en el genoma. En estas realizaciones, el promotor puede ser un promotor constitutivo, concretamente un promotor que, cuando se introduce en una célula y se liga operativamente con una secuencia en dirección 3', dirige la transcripción de la secuencia en dirección 3' tras la introducción en la célula, sin necesidad de adición de moléculas inductoras o un cambio a condiciones inductoras. Como alternativa, el promotor puede ser inducible, de modo que la célula producirá solo el ARN mensajero funcional codificado por el constructo cuando la célula se exponga al estímulo apropiado (inductor). Cuando se usa un promotor inducible, se introducen los constructos colaboradores en la célula de empaquetamiento simultáneamente a, antes de o después de la exposición al inductor, y aparece la expresión de las proteínas estructurales alfavíricas cuando están presentes tanto constructos como inductor. Como alternativa, pueden introducirse en la célula los constructos diseñados para funcionar en una célula mediante un vector vírico, p.ej. adenovirus, poxvirus, virus adenoasociados, SV40, retrovirus, nodavirus, picornavirus, virus de la estomatitis vesicular y baculovirus con promotores pol II de mamífero.

Una vez está presente en la célula colaboradora un transcrito de ARN (ARNm) que codifica los vectores colaborador o de replicón de ARN (por enfoques *in vitro* o *in vivo*, como se describen anteriormente), se traduce dado el caso para producir los polipéptidos o proteínas codificados. En ciertas realizaciones, se transcribe el replicón de vector de ARN *in vitro* a partir de un plásmido de ADN y se introduce entonces en la célula hospedadora por electroporación. En otras realizaciones, se transcribe el replicón de vector de ARN *in vivo* a partir de un plásmido de vector de ADN que se transfecta en la célula colaboradora (véase, p.ej., la patente de EE.UU. nº 5.814.482) o se suministra a la célula colaboradora mediante un virus o partícula de tipo virus.

Se diseña el replicón de vector de ARN alfavírico para expresar una o más secuencias de codificación heterólogas o ARN funcional o funcionales de interés, a los que se hace referencia también en la presente memoria como ARN heterólogo o secuencia heteróloga, que pueden elegirse de una amplia variedad de secuencias derivadas de virus, procariotas o eucariotas. Los ejemplos de categorías de secuencias heterólogas incluyen, pero sin limitación, inmunógenos (incluyendo proteínas, péptidos, epítopos o fragmentos inmunogénicos antigénicos nativos, modificados o sintéticos), citocinas, toxinas, proteínas terapéuticas, enzimas, secuencias anticodificantes y moduladores de la respuesta inmunitaria.

Cualquier aminoácido que aparezca en las secuencias aminoacídicas a la que se hace referencia en la memoria descriptiva tiene sus abreviaturas habituales de tres y una letra usadas rutinariamente en la materia: A, Ala, alanina; C, Cys, cisteína; D, Asp, ácido aspártico; E, Glu, ácido glutámico; F, Phe, fenilalanina; G, Gly, glicina; H, His, histidina; I, Ile, isoleucina; K, Lys, lisina; L, Leu, leucina; M, Met, metionina; N, Asn, asparagina; P, Pro, prolina; Q, Gln, glutamina; R, Arg, arginina; S, Ser, serina; T, Thr, treonina; V, Val, valina; W, Try, triptófano; Y, Tyr, tirosina.

Como se usa en la presente memoria, la expresión dirigida por una secuencia particular es la transcripción de una secuencia asociada en dirección 3'. Si es apropiado y deseado para la secuencia asociada, el término expresión engloba también traducción (síntesis de proteína) del ARN transcrito o introducido. Como alternativa, pueden usarse diferentes secuencias para dirigir la transcripción y traducción.

Las células permisivas de alfavirus empleadas en los métodos de la presente invención son células que, tras transfección con un transcrito de ARN vírico completo, son capaces de producir partículas víricas. Los alfavirus

tienen un amplio intervalo de hospedadores. Los ejemplos de células de empaquetamiento adecuadas incluyen, pero sin limitación, células Vero, células de riñón de hámster recién nacido (BHK), fibroblastos de embrión de pollo, DF-1, 293, 293T, células de ovario de hámster chino (CHO) y células de insecto.

Las frases "proteína estructural" o "proteína estructural alfavírica" como se usan en la presente memoria hacen referencia a una o más de las proteínas codificadas por alfavirus que son necesarias para empaquetar el replicón de ARN, e incluyen típicamente la proteína de cápsida, glicoproteína E1 y glicoproteína E2 en los alfavirus maduros (ciertos alfavirus, tales como virus del bosque Semliki, contienen una proteína adicional, E3, en la cubierta madura). El término "proteína o proteínas estructurales alfavíricas" hace referencia a una o una combinación de proteínas estructurales codificadas por alfavirus. Estas se sintetizan (a partir del genoma vírico) en forma de una poliproteína y se representan generalmente en la bibliografía como C-E3-E2-6k-E1. E3 y 6k sirven como señales de translocación/transporte de membrana para las dos glicoproteínas E2 y E1. Por tanto, el uso del término E1 en la presente memoria puede hacer referencia a E1, E3-E1, 6k-E1 o E3-6k-E1, y el uso del término E2 en la presente memoria puede hacer referencia a E2, E3-E2, 6k-E2 o E3-6k-E2.

Como se describe en la presente memoria, las proteínas estructurales del alfavirus se distribuyen entre una o más moléculas de ácido nucleico colaborador (p.ej., un primer ARN (o ADN) colaborador y un segundo ARN (o ADN) colaborador)). Además, una o más proteínas estructurales pueden estar localizadas en la misma molécula que el ácido nucleico de replicón, a condición de que se elimine al menos una proteína estructural del ARN de replicón de tal modo que el replicón y la partícula alfavírica resultante sean defectivos de replicación. Como se usa en la presente memoria, los términos "eliminado" o "delección" significan la delección total del segmento especificado o la delección de una porción suficiente del segmento especificado para volver el segmento inoperativo o no funcional, de acuerdo con la utilización estándar. Véase, p.ej., la patente de EE.UU. n° 4.650.764 de Ternin *et al.* El término "defectivo de replicación" como se usa en la presente memoria es sinónimo de "defectivo de propagación" y significa que las partículas producidas en una célula hospedadora dada no pueden producir partículas de progenie en la célula hospedadora debido a la ausencia de la función colaboradora, concretamente las proteínas estructurales alfavíricas necesarias para empaquetar el ácido nucleico de replicón. Sin embargo, el ácido nucleico de replicón es capaz de replicarse a sí mismo y expresarse en la célula hospedadora en que se ha introducido.

La célula colaboradora, a la que se hace referencia también como célula de empaquetamiento, usada para producir las partículas alfavíricas infecciosas defectivas de replicación debe expresar o ser capaz de expresar proteínas estructurales alfavíricas suficientes para empaquetar el ácido nucleico de replicón. Las proteínas estructurales pueden producirse a partir de un conjunto de ARN, típicamente dos, que se introducen en la célula colaboradora simultáneamente a o antes de la introducción del vector de replicón. El primer ARN colaborador incluye ARN que codifica al menos una proteína estructural alfavírica pero que no codifica todas las proteínas estructurales alfavíricas. El primer ARN colaborador puede comprender ARN que codifica la glicoproteína E1 alfavírica pero que no codifica la proteína de cápsida alfavírica y la glicoproteína E2 alfavírica. Como alternativa, el primer ARN colaborador puede comprender ARN que codifica la glicoproteína E2 alfavírica pero que no codifica la proteína de cápsida alfavírica y la glicoproteína E1 alfavírica. En una realización adicional, el primer ARN colaborador puede comprender ARN que codifica la glicoproteína E1 alfavírica y la glicoproteína E2 alfavírica pero no la proteína de cápsida alfavírica. En una cuarta realización, el primer ARN colaborador puede comprender ARN que codifica la cápsida alfavírica pero ninguna de las glicoproteínas alfavíricas. En una quinta realización, el primer ARN colaborador puede comprender ARN que codifica la cápsida y una de las glicoproteínas, concretamente E1 o E2, pero no ambas.

En combinación con uno cualquiera de estos primeros ARN colaboradores, el segundo ARN colaborador codifica al menos una proteína estructural alfavírica no codificada por el primer ARN colaborador. Por ejemplo, cuando el primer ARN colaborador codifica solo la glicoproteína E1 alfavírica, el segundo ARN colaborador puede codificar una o ambas de la proteína de cápsida alfavírica y la glicoproteína E2 alfavírica. Cuando el primer ARN colaborador codifica solo la proteína de cápsida alfavírica, el segundo ARN colaborador puede incluir ARN que codifica una o ambas de las glicoproteínas alfavíricas. Cuando el primer ARN colaborador codifica solo la glicoproteína E2 alfavírica, el segundo ARN colaborador puede codificar una o ambas de la proteína de cápsida alfavírica y la glicoproteína E1 alfavírica. Cuando el primer ARN colaborador codifica tanto la cápsida como la glicoproteína E1 alfavírica, el segundo ARN colaborador puede incluir ARN que codifica una o ambas de la proteína de cápsida alfavírica y la glicoproteína E2 alfavírica.

En todos los ácidos nucleicos colaboradores, se entiende que estas moléculas comprenden adicionalmente las secuencias necesarias para la expresión (que engloban señales de traducción y, cuando sea apropiado, transcripción o replicación) de las secuencias de proteína estructural codificadas en las células colaboradoras. Dichas secuencias pueden incluir, por ejemplo, promotores (víricos, procarióticos o eucarióticos, inducibles o constitutivos) y secuencias de reconocimiento de replicasa vírica 5' y 3'. En el caso de que los ácidos nucleicos colaboradores expresen una o más glicoproteínas, se entiende en la materia que estas secuencias se expresan ventajosamente con una secuencia líder o señal en el extremo N de la región de codificación de la proteína estructural en los constructos de ácido nucleico. La secuencia líder o señal puede derivar del alfavirus, por ejemplo E3 o 6k, o puede ser una secuencia heteróloga tal como un péptido señal de activador de plasminógeno de tejido o una secuencia sintética. Por tanto, como ejemplo, el primer ácido nucleico colaborador puede ser una molécula de ARN que codifica cápsida-E3-E1, y el segundo ácido nucleico colaborador puede ser una molécula de ARN que codifica cápsida-E3-E2. Como alternativa, el primer ARN colaborador puede codificar la cápsida sola, y el segundo

ARN colaborador puede codificar E3-E2-6k-E1. Adicionalmente, la señal de empaquetamiento o “secuencia de encapsidación” que está presente en el genoma vírico no está presente en todos los ácidos nucleicos colaboradores. Preferiblemente, se elimina la señal de empaquetamiento de todos los ácidos nucleicos colaboradores.

5 Estos ARN colaboradores pueden introducirse en las células de una serie de modos. Pueden expresarse a partir de uno o más módulos de expresión que se han transformado establemente en las células, estableciendo así estirpes celulares de empaquetamiento (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6.242.259). Como alternativa, los ARN pueden introducirse como moléculas de ARN o ADN que pueden expresarse en la célula hospedadora sin integrarse en el genoma celular. Los métodos de introducción incluyen electroporación, vectores víricos (p.ej. SV40, adenovirus, nodavirus, astrovirus) y transfección mediada por lípido.

10 Es una alternativa a los múltiples ARN colaboradores el uso de una única molécula de ADN que codifica todos los polipéptidos necesarios para empaquetar el ARN de replicón vírico en partículas de replicón alfavírico infecciosas. El ADN colaborador único puede introducirse en la célula de empaquetamiento mediante cualquier medio conocido en la materia incluyendo, pero sin limitación, electroporación, transfección mediada por lípido (lipofección), transfección vectorizada por virus (p.ej. adenovirus o SV-40) o mediada por fosfato. Preferiblemente, se introduce el ADN mediante los métodos basados en electroporación de esta invención. El ADN se electropora típicamente en células con una disminución del voltaje y un aumento de la capacitancia, en comparación con los necesarios para la captación de ARN. En todas las electroporaciones, debe fijarse el valor de voltaje y capacitancia para evitar destruir la capacidad de las células de empaquetamiento (hospedadoras) de producir partículas alfavíricas infecciosas. Como alternativa, puede incorporarse la función colaboradora, en este formato y bajo un promotor inducible, al genoma de la célula de empaquetamiento antes de la introducción/expresión del replicón de vector de ARN, e inducirse entonces con el estímulo apropiado justo antes de, simultáneamente a o después de la introducción del replicón de vector de ARN.

25 Ventajosamente, uno o más de los ácidos nucleicos que codifican las proteínas estructurales alfavíricas, concretamente cápsida, glicoproteína E1 y glicoproteína E2, o el constructo de replicón, contienen una o más mutaciones atenuantes. Las frases “mutación atenuante” y “aminoácido atenuante”, como se usan en la presente memoria, significan una mutación nucleotídica (que puede estar o no en una región del genoma vírico que codifica polipéptidos) o un aminoácido codificado por una mutación nucleotídica, que en el contexto de un virus vivo da como resultado una probabilidad disminuida de que el alfavirus cause enfermedad en su hospedador (concretamente, una pérdida de virulencia), de acuerdo con la terminología estándar en la materia, véase p.ej. B. Davis, *et al.*, “Microbiology” 156-158, (4ª ed. 1990), tanto si la mutación es una mutación por sustitución por delección o adición en fase. La frase “mutación atenuante” excluye mutaciones que serían letales para el virus, a menos que se use dicha mutación en combinación con una mutación “restablecedora” que vuelva el virus viable, aunque atenuado. Son conocidos en la materia métodos para identificar mutaciones atenuantes adecuadas en el genoma alfavírico. Olmsted *et al.* (1984; Science 225: 424) describe un método de identificación de mutaciones atenuantes en el virus de Sindbis mediante selección para crecimiento rápido en cultivo celular. Johnston y Smith (1988; Virology 162:437) describen la identificación de mutaciones atenuantes en VEE aplicando presión selectiva directa para una penetración acelerada de células BHK. Se han descrito mutaciones atenuantes en alfavirus en la materia, p.ej., White *et al.* 2001 J. Virology 75: 3706; Kinney *et al.* 1989 Virology 70: 19; Heise *et al.* 2000 J. Virology 74: 4207; Bernard *et al.* 2000 Virology 276: 93; Smith *et al.* 2001 J. Virology 75: 11196; Heidner y Johnston 1994 J. Virology 68: 8064; Klimstra *et al.* 1999 J. Virology 73: 10387; Glasgow *et al.* 1991 Virology 185:741; Polo y Johnston 1990 J. Virology 64: 4438 y Smerdou y Liljestrom 1999 J. Virology 73:1092.

45 En ciertas realizaciones, el ARN de replicón comprende al menos una mutación atenuante. En otras realizaciones específicas, el ácido o ácidos nucleicos colaboradores incluyen al menos una mutación atenuante. En realizaciones que comprenden dos moléculas de ácido nucleico colaboradores, al menos una molécula incluye al menos una mutación atenuante, o ambas pueden codificar al menos una mutación atenuante. Como alternativa, el ácido nucleico colaborador, o al menos uno del primer o segundo ácidos nucleicos colaboradores, incluye al menos dos o múltiples mutaciones atenuantes. Las mutaciones atenuantes apropiadas dependen del alfavirus usado. Por ejemplo, cuando el alfavirus es VEE, pueden seleccionarse las mutaciones atenuantes adecuadas del grupo consistente en los codones en posición aminoacídica 76 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina, arginina o histidina, como aminoácido 76 de E2; los codones en posición aminoacídica 120 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina, como aminoácido 120 de E2; los codones en posición aminoacídica 209 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina, arginina o histidina, como aminoácido 209 de E2; los codones en posición aminoacídica 272 de E1 que especifican una mutación atenuante, preferiblemente serina o treonina, como aminoácido 272 de E1; los codones en la posición aminoacídica 81 de E1 que especifican una mutación atenuante, preferiblemente isoleucina o leucina, como aminoácido 81 de E1 y los codones en el aminoácido 253 de E1 que especifican una mutación atenuante, preferiblemente serina o treonina, como aminoácido 253 de E1. Las mutaciones atenuantes adicionales incluyen delecciones o mutaciones de sustitución en el dominio de escisión entre E3 y E2 tales que la poliproteína E3/E2 no se escinda; esta mutación en combinación con la mutación en E1-253 es una cepa atenuada preferida para uso en esta invención. De forma similar, las mutaciones presentes en cepas de vacuna viva existentes, p.ej., la cepa TC83 (véase Kinney *et al.*, 1989, Virology 170: 19-30, particularmente la mutación en el nucleótido 3), se emplean ventajosamente también en las partículas purificadas por los métodos de esta invención.

5 Cuando el alfavirus es el arbovirus sudafricano nº 86 (S.A. AR86), pueden seleccionarse las mutaciones atenuantes adecuadas del grupo consistente en los codones en la posición aminoacídica 538 de nsP1 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente isoleucina, como aminoácido 538 de nsP1; los codones en la posición aminoacídica 304 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente treonina, como posición aminoacídica 304 de E2; los codones en posición aminoacídica 314 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina, como aminoácido 314 de E2; los codones en posición aminoacídica 376 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente alanina, como aminoácido 376 de E2; los codones en la posición aminoacídica 372 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente leucina, como aminoácido 372 de E2; los codones en posición aminoacídica 96 de nsP2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente glicina, como aminoácido 96 en nsP2 y los codones en la posición aminoacídica 372 de nsP2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente valina, como aminoácido 372 de nsP2. Las mutaciones atenuantes adecuadas en realizaciones en las que se emplean otros alfavirus son conocidas por los especialistas en la materia.

15 Las mutaciones atenuantes pueden introducirse en el ARN efectuando mutagénesis dirigida a sitio en el ADNc que codifica el ARN, de acuerdo con procedimientos conocidos. Véase Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488 (1985). Como alternativa, pueden introducirse mutaciones en el ARN mediante reemplazo de los fragmentos de restricción homólogos en el ADNc que codifica ARN, de acuerdo con procedimientos conocidos, o en copias de ADNc usando métodos de reacción en cadena de la polimerasa mutagénicos.

20 La presente invención proporciona métodos mejorados para la preparación de partículas de replicón alfavírico infecciosas, defectivas de propagación y altamente inmunogénicas con altos rendimientos. En las partículas de replicón antivírico (ARP), se genomanipula un vector alfavírico, al que se hace referencia en la presente memoria como replicón, para contener y expresar uno o más genes de interés, en que el gen de interés puede codificar, por ejemplo, un antígeno, una quimiocina, una citocina, una ribozima o una enzima. El vector de replicación alfavírico puede derivar de cualquier alfavirus, tales como el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), el virus de Sindbis, p.ej. la cepa TR339, el arbovirus sudafricano nº 86 y el virus del bosque Semliki, entre otros. Se introduce entonces el vector en células de cultivo que permiten la replicación de alfavirus y en que se expresan también las proteínas estructurales de los alfavirus, de modo que el vector se empaqueta por las proteínas estructurales en ARP que se liberan dado el caso de la célula. La presente invención es también aplicable a la preparación y recolección de partículas alfavíricas vivas atenuadas, incluyendo partículas como se describen en la patente de EE.UU. nº 5.643.576, y cepas alfavíricas atenuadas usadas como vacunas contra alfavirus.

35 Debido a que los métodos tradicionales de producción y recolección de ARP son caros, ineficaces y laboriosos, los presentes inventores examinaron diversos parámetros para conseguir un rendimiento de ARP mejorado simplificando el proceso y disminuyendo el coste por ARP. El proceso novedoso implica innovaciones en las etapas de preparación de ácido nucleico, cultivo celular, manipulación celular para producir las ARP, recolección de ARP y formulación de ARP, y este proceso tiene el beneficio de aumentar los rendimientos de ARP y reducir el coste por ARP significativamente.

40 En todos los informes anteriores, se purificaban las ARP a partir del medio, o sobrenadante de cultivo, en que crecían las células que producen las ARP. Sorprendentemente, cuando los presentes inventores lavaron las células productoras de ARP con una disolución acuosa que contenía una sal a una concentración mayor que la empleada típicamente en un medio de crecimiento normal, se liberaba un número significativo de ARP infecciosas de las células y/o desechos celulares. Se comparó la inmunogenicidad de las ARP recolectadas después de la etapa de lavado salino con la de las ARP elaboradas según métodos conocidos, y la potencia de respuesta ante las ARP recolectadas con lavado salino era tan buena como mejor que la de las partículas de ARP liberadas inicialmente en el medio antes del lavado salino.

45 En muchas aplicaciones, el uso del proceso de lavado salino para recolectar ARP, como se describe anteriormente, puede obviar la necesidad de recolectar ARP del medio de cultivo celular, debido al gran número de partículas retenidas por las células antes del lavado salino. La relación de ARP presentes en el medio antes de un lavado salino con las ARP retenidas por las células y liberadas con un lavado salino puede ser de 1:1 a 1:400, dependiendo de los tipos celulares, condiciones de crecimiento celular y condiciones de lavado salino. En células Vero, la relación es típicamente de al menos 1:3, más comúnmente de 1:10, 1:00 o 1:400 (véase la Figura 4), dependiendo del grado de optimización de los demás parámetros de la invención reivindicada.

50 Por lo tanto, se dan a conocer en la presente memoria un método o métodos para preparar ARP portadores de mutaciones que confieren la capacidad de unión a glicosaminoglicano en células hospedadoras de mamífero, que comprenden las etapas de (a) introducir un ácido nucleico de replicón alfavírico en una célula hospedadora permisiva de alfavirus, conteniendo dicho ácido nucleico de replicón al menos una señal de empaquetamiento alfavírico y al menos una secuencia de codificación heteróloga de un gen o genes de interés expresables en dicho ácido nucleico de replicón alfavírico, en los que la célula hospedadora comprende al menos una función colaboradora, produciendo una célula hospedadora modificada; (b) cultivar dicha célula hospedadora modificada en un medio en condiciones que permitan la expresión de al menos una función colaboradora, permitiendo la replicación del ácido nucleico de replicón alfavírico y empaquetando entonces el ácido nucleico de replicón alfavírico formando ARP; (c) poner en contacto las células hospedadoras modificadas después de la etapa (b) con una

disolución acuosa de lavado salino que tiene una fuerza iónica de 0,5 a 5 M (en la presente memoria el “medio de liberación”) para liberar las ARP y producir una disolución que contiene ARP y (d) recolectar las ARP de la disolución que contiene ARP de la etapa (c) seguido de cromatografía de afinidad con heparina.

5 La etapa (c) se efectúa con una disolución acuosa de lavado salino medio de liberación, y el rendimiento de “lavado salino” de ARP (concretamente las ARP recolectadas en el medio de liberación) será en parte función de la duración del tiempo que las células estén expuestas a medio de liberación. Este periodo de tiempo puede ser de 1 minuto a varias horas; de 5 a 20 minutos es típico. En una realización preferida, se usa una disolución de sal 0,5 M y se incuban las células en esta disolución durante aproximadamente 5 minutos. La combinación óptima de concentración salina en el medio de liberación y tiempo de incubación puede determinarse directamente por un especialista en la materia, y será adicionalmente función del tipo celular y del dispositivo de soporte celular.

10 La sorprendente observación de que muchas de las ARP se retienen por las células proporciona la oportunidad de lavar las células concienzudamente antes de la liberación de las ARP de las células a una disolución que contiene sal, reduciendo así significativamente la necesidad de purificación posterior de las ARP. Se usan eficazmente por tanto monocapas celulares como matriz de afinidad para las ARP.

15 Por tanto, en una realización preferida, se cultivan las células como se describe en la etapa (b) anterior, en un contenedor tal como un matraz de cultivo celular, botella rotatoria, dispositivo de Cell-cube, recipiente de cultivo (incluyendo biorreactor y matraz de agitación) con perlas para crecimiento celular adherido, o un dispositivo de fibra hueca, en que las células se dejan incubar de aproximadamente 12 a 48 horas, preferiblemente 16-24 horas, generando ARP. En caso de que se utilicen células de mamífero, las células se adhieren típicamente a las superficies internas del contenedor u otro soporte sólido incluyendo, pero sin limitación, perlas, partículas de poliestireno, fibras huecas y similares, y después del periodo de incubación necesario, se retira deseablemente el medio de cultivo (se decanta, aspira o similar) de las células y se reserva o desecha, separando así las células hospedadoras modificadas del medio de cultivo celular. Como alternativa, pueden centrifugarse las células que crecen en cultivo en suspensión para retirar las células del medio de crecimiento. Pueden lavarse entonces las células extensamente en una disolución de “lavado celular”, que es un medio bajo en sal o que no contiene sal que contiene opcionalmente componentes adicionales para ayudar a retirar materiales externos, p.ej. una preparación de ADNasa u otros productos químicos que retiran el ADN celular o proteinasas residuales. Es una ADNasa comercialmente disponible la benzonasa, una desoxirribonucleasa de *Serratia marcescens* disponible en Novagen/EMD Biosciences, Madison, WI (véase también la patente de EE.UU. nº 5.173.418). Puede incorporarse al medio después de la electroporación a una concentración de aproximadamente 10 a aproximadamente 1.000 unidades/ml. Cuando la ADNasa, p.ej. benzonasa, se incorpora a la preparación de ARP, se usa a una concentración de 100 a 5.000 unidades por ml, deseablemente a aproximadamente 500 unidades por ml, con incubación a 30 a 37 °C durante 10 a 90 minutos, deseablemente aproximadamente 30 minutos. Se presentan en la Figura 4 ejemplos de medios de liberación útiles (disoluciones de lavado celular para la liberación de ARP unidas). Estos resultados indican que la disolución de lavado celular puede optimizarse para cada combinación de cepa alfarívica y célula para maximizar la retención de las ARP (o partículas alfarívicas) por el sustrato celular y minimizar su liberación en el medio antes de la adición del medio de liberación. Al maximizar la retención de ARP por las células, puede no ser eficaz ni económico recolectar los números mucho menores de partículas presentes en el medio de cultivo celular.

40 Después de este extenso lavado, se exponen entonces las células al medio de liberación y se liberan las ARP en el medio a partir de las células hospedadoras. El medio de liberación es una disolución acuosa de lavado salino que contiene sal de 0,50 M a 5 M, y es típicamente un volumen mucho menor que el volumen de medio en que se hicieron crecer las células, p.ej. una reducción de volumen de 10 a 50 veces. Puede contener componentes adicionales tales como ADNasa (particularmente si no se usó en la disolución de lavado celular) y estabilizantes, p.ej. HSA y sacarosa. La temperatura de la etapa de liberación no es crítica, se han obtenido resultados similares a 4 °C, temperatura ambiente y 37 °C. Se obtienen resultados similares con lavados salinos (en medio de liberación) de 10 a 30 min.

50 El medio de liberación puede elaborarse a la fuerza iónica deseada con sales que incluyen, pero sin limitación, NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, NH₄Cl, sulfato de NH₄, acetato de NH₄ y bicarbonato de NH₄. Deseablemente, el pH del medio de liberación es compatible con el mantenimiento de la integridad celular, p.ej. de aproximadamente 6 a aproximadamente 9,0, o de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5. En realizaciones específicas, el uso de sales volátiles en el medio de liberación tales como sales de amonio volátiles, especialmente acetato o bicarbonato de amonio, permite liofilizar la disolución que contiene ARP resultante, con el resultado de que se retira la sal de la preparación de ARP concentrada.

55 Se ensayaron en varias sales sus capacidades de facilitar la recolección y recuperación de ARP de células Vero a las 16 h y 24 horas después de la electroporación. NaCl 1 M a pH 7,2, acetato de amonio 1 M a pH 7,35, bicarbonato de amonio 1 M a pH 7,4, cloruro de magnesio 1 M a pH 7,2, acetato de sodio 1 M a pH 7,35 y sulfato de amonio 1 M a pH 7,35 dieron todos resultados equivalentes y buenos. Aumentar la concentración salina en el medio de liberación de 0,5 a 5 M no afectaba al rendimiento de ARP. Usar una concentración hacia la menor cantidad eficaz evitaba la necesidad de cargar grandes volúmenes diluidos en los medios cromatográficos. Fosfato de sodio 20 mM a pH 7,2, fosfato de sodio 20 mM a pH 6,5, fosfato de sodio 50 mM a pH 7,2 y fosfato de sodio 20 mM a pH

7,2 con 0,1 % de Tween 80 no servían para liberar eficazmente ARP de las células productoras. Se llevaron a cabo los lavados con medio de liberación a 4 °C, temperatura ambiente y 37 °C; la temperatura de lavado no afectaba al rendimiento.

5 Se estudió también el efecto del medio en el que se disponen las células inmediatamente después de la electroporación, concretamente el medio después de electroporación. Véase el Ejemplo 3. Sorprendentemente, se obtuvieron buenos rendimientos usando medio exento de suero, a menudo equivalentes a medio que contiene suero, ofreciendo por tanto ventajas respecto a la seguridad potencial de los productos usados y también en la reducción de la cantidad de proteína potencialmente asociada a las células permisivas de alfavirus y partículas víricas o partículas de tipo virus.

10 El medio de cultivo que puede separarse de las células después de la etapa (b) puede combinarse con la disolución que contiene ARP descrita anteriormente en la presente memoria, y las ARP pueden purificarse de una vez a partir de estas dos fracciones anteriormente separadas. Como alternativa, las ARP pueden purificarse separadamente del medio de cultivo y combinarse entonces con las partículas retiradas por lavado salino.

15 En general, todas las etapas de la invención reivindicada, incluyendo el crecimiento de células antes de la producción de ARP, pueden efectuarse en medio exento de suero.

Aunque son conocidos muchos métodos para la introducción de moléculas de ácido nucleico en células hospedadoras, es un método particularmente útil la electroporación. Los presentes inventores determinaron que se obtenían rendimientos de ARP mejorados cuando estaban presentes tanto células como ácidos nucleicos de aporte en las mezclas de electroporación a concentraciones mayores que las anteriormente recomendadas o usadas.

20 Generalmente, la función de la electroporación es usar un campo eléctrico para crear poros o aberturas en las membranas celulares suficientes para permitir la entrada de ácidos nucleicos. Están actualmente disponibles comercialmente muchos dispositivos en que electroporar células, incluyendo cubetas desechables (típicamente que contienen entre 0,8 y 4 ml de medio), electrodos de placa Petri y aparatos de circulación u otras cámaras de electroporación. Hay extensas enseñanzas en la materia sobre la optimización de estos dispositivos para la electroporación de células para efectuar una transformación genética, variando parámetros tales como voltaje, duración de pulso, geometría del dispositivo, potencia de campo requerida (que es función de cada tipo celular y depende del radio celular y de su voltaje de degradación crítico) y distancia entre los electrodos. Adicionalmente, la densidad de las células es también un factor, y las recomendaciones de los fabricantes están entre $1-5 \times 10^6$ células/ml para células Vero y NIH-3T3, y ligeramente mayor para células BHK y CHO, siendo ambas menores que las células Vero (véanse, p.ej., Multiporator® Cuvette Manual, Brinkmann, Westbury, NY; Genetronics, San Diego, CA (BTX Division) Protocols for the ElectroCell Manipulator (ECM®) o ElectroSquarePorator™; Parham, J. *et al.* 1999 CytoTechnology 28: 1-9). La materia enseña que las densidades celulares mayores que las recomendadas dan como resultado condiciones de campo no homogéneas en el medio de electroporación, que pueden conducir a la fusión celular. Liljestrom y Garoff, J. *Virology* 65: 4107-4113, 1991, usaron la electroporación para introducir un único colaborador de ARN con caperuza y un ARN de replicón del virus del bosque Semliki en células BHK a una concentración de 5×10^6 células/ml.

De forma similar, la concentración de ácidos nucleicos usada en la materia se ha determinado empíricamente y se recomienda generalmente que esté entre 5-20 µg de ADN por ml de tampón de electroporación, consideradas cantidades mayores eficaces solo para ácidos nucleicos grandes. Liljestrom y Garoff (1991) estudiaron el efecto de la concentración de ARN en la electroporación y reseñaron que la eficacia de captación no era linealmente dependiente de la concentración de ARN y que 2 µg eran suficientes para obtener una eficacia de transfección del 100 % en una electroporación en cubeta.

45 En la presente invención, se obtienen resultados mejorados (rendimiento de ARP por célula hospedadora) cuando se lleva a cabo la electroporación usando células hospedadoras a una densidad celular de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 1×10^9 por ml de medio de electroporación. Más preferiblemente, la densidad celular en el medio de electroporación es de aproximadamente 5×10^7 a 5×10^8 células por ml. Como se ejemplifica específicamente en la presente memoria, se lleva a cabo la electroporación en una cubeta de electroporación, pero pueden usarse también una placa Petri o un dispositivo de electroporación con circulación, estando ambos comercialmente disponibles. Pueden usarse otros tipos de electroporación. Se obtuvieron resultados mejorados con concentraciones de células Vero de aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 5×10^8 por ml. Por ejemplo, con 10^8 células en una cubeta de 0,4 cm de paso, se han obtenido de 10^{10} a 10^{11} ARP a partir de un único evento de electroporación. Pueden obtenerse rendimientos equivalentes basados en célula y volumen escalando apropiadamente los parámetros en otros dispositivos de electroporación. Como alternativa, pueden usarse CHO, BHK, CEF, 293T y fibroblastos de embrión de pollo. Pueden usarse también células de insecto cultivadas, como se discute anteriormente en la presente memoria.

Con un intervalo de concentración celular optimizado para electroporación de replicón-colaborador, cada ARN colaborador de aporte está presente a aproximadamente 10 a 50, deseablemente a aproximadamente 35 microgramos por ml (µg/ml), y el ARN de replicón está presente a aproximadamente 10 a 150 µg/ml, deseablemente a aproximadamente 35 µg/ml. En otras realizaciones, se usan uno o más colaboradores de ADN. La concentración

de colaborador o colaboradores de ADN usados en electroporación es típicamente mayor que la usada para colaboradores de ARN, p.ej. entre 100 y 200 µg/ml. Usando colaboradores de ARN o ADN, la cantidad de replicón de ARN alfavírico añadida a las células antes de la electroporación es de aproximadamente al menos 35 µg/ml.

5 Por tanto, se da a conocer en la presente memoria un método para preparar ARP que comprende introducir un vector de replicón alfavírico en un cultivo celular permisible de alfavirus mediante electroporación, en el que la concentración de las células en el medio de cultivo durante la electroporación es de al menos 10^7 células/ml de medio, preferiblemente entre 5×10^7 y 5×10^8 células/ml de medio. Aunque los métodos preferidos de la invención reivindicada implican el uso de un ARN de replicón que se introduce entonces en la célula, es un enfoque alternativo introducir el ARN de replicón a través de una molécula de ADNc que codifica el ARN de replicón. Se hace referencia a veces a este enfoque como un sistema de iniciación de vectores eucarióticos por capas (ELVIS), como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.814.482 y 6.015.686.

15 Las proteínas estructurales alfavíricas producidas en la célula hospedadora pueden codificarse por una o más secuencias de ácido nucleico integradas establemente en el genoma de dicha célula hospedadora, o pueden introducirse en la célula hospedadora de forma transitoria, simultáneamente o antes de la introducción del ácido nucleico de replicón alfavírico. Deseablemente, las proteínas estructurales alfavíricas proporcionadas en la célula hospedadora se expresan a partir de una o dos moléculas de ácido nucleico (ARN o ADN) que codifican una proteína de cápsida alfavírica capaz de unirse a un ácido nucleico de replicón alfavírico y al menos una glicoproteína alfavírica, en las que dicha glicoproteína alfavírica se asocia con el ácido nucleico de replicón alfavírico y la proteína de cápsida. Cuando se añaden como ácidos nucleicos mediante electroporación, el uno o más ácidos nucleicos colaboradores pueden coelectroporarse con el ARN de replicón. En la práctica del método de esta invención con un único ácido nucleico colaborador, es un intervalo útil para la relación molar de ARN de replicón:ácido nucleico colaborador entre 1:2 y 1:8, y es un intervalo útil para la relación molar de ARN de replicón:primer colaborador:segundo colaborador entre 1:2:2 y 1:5:5. Generalmente, puede optimizarse la concentración de cada colaboradora por experimentación rutinaria, y no es necesario ni esperado que ambos colaboradores se usen en cantidades equimolares, particularmente si un colaborador es una molécula de ARN y el otro colaborador es una molécula de ADN. Las cantidades de molécula o moléculas colaboradoras pueden aumentarse respecto a la cantidad de ácido nucleico de replicón, pero independientemente entre sí en el caso de dos colaboradores, para determinar la concentración de colaborador o colaboradores que genera la máxima concentración de ARP. En una realización específica de un único colaborador de ADN que expresa todas las proteínas estructurales alfavíricas (p.ej., un colaborador que expresa todas las proteínas estructurales de VEE es de aproximadamente 8,7 kb de longitud), es una relación molar útil de ARN de replicón:colaborador de ADN aproximadamente 1:6. De forma similar, se electroporaron 30 µg de vector de replicón de VEE que codifica la proteína gag de VIH y 100-150 µg de colaborador de ADN (promotor de CMV) en células Vero para producción de ARP. El ADN estaba altamente purificado para retirar los contaminantes tóxicos y se concentró a aproximadamente 5 mg/ml antes de la electroporación. Generalmente, es preferible concentrar el ADN a entre 1 y 8 mg/ml, preferiblemente entre 5 y 8 mg/ml. El colaborador de ADN está presente en la mezcla de electroporación a aproximadamente 20-500, deseablemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 300, por ejemplo a aproximadamente 150 µg por 0,8 ml de mezcla de electroporación, que contiene deseablemente de aproximadamente 5×10^7 a aproximadamente 2×10^8 células, por ejemplo aproximadamente $1,2 \times 10^8$ células.

40 Es un aspecto del proceso eficaz de la presente invención, para aquellas realizaciones que utilizan ARN de replicón y/o colaborador, llevar a cabo la transcripción a partir del vector de ADN linealizado que codifica los ácidos nucleicos de replicón y colaborador sin purificación de ese ADN después de su linealización por digestión con enzima de restricción. Se desarrolló un protocolo para digestión con enzima de restricción y transcripción de ARN en el mismo tampón de transcripción de ARN (reacción acoplada). El rendimiento del ARN, si se calcula por peso de ADN de aporte, era 2-3 veces mayor en la reacción acoplada en comparación con los métodos anteriores en que se purificó el ADN después de la linealización y antes de la transcripción de ARN.

50 Proceden ahorros adicionales en costes, reactivos y esfuerzos que contribuyen a esta invención del descubrimiento de que pueden usarse el o los ARN colaboradores sin caperuza en la reacción de electroporación. El Ejemplo 1 describe los experimentos que se llevaron a cabo para determinar la eficacia del o de los ARN sin caperuza para uso en electroporación junto con un ARN de replicón (véase también la Figura 1).

55 Se examinó si era necesaria una estructura de caperuza en los ARN colaboradores para que se replicaran y proporcionaran proteínas estructurales con las que empaquetar los ARN de replicón (Ejemplo 1). Aunque no debería haber un requisito teórico de caperuza en los ARN colaboradores, los datos existentes de los laboratorios de los inventores, así como de otros laboratorios, indicaban que los colaboradores sin caperuza no funcionaban eficazmente (como mucho) cuando generaban ARP. No obstante, debido al gasto asociado a la caperuza de los ARN colaboradores y al potencial de aumentar significativamente el rendimiento de ARN de las reacciones de transcripción si no se usaba el análogo de caperuza, se iniciaron estudios sobre el uso de colaboradores sin caperuza para generar ARP. Se electroporaron células Vero con ARN de replicón junto con ARN colaboradores con caperuza o sin caperuza. Sorprendentemente, se generaron ARP de título equivalente con colaboradores de ARN con caperuza o sin caperuza (Figura 1), a condición de que los colaboradores de ARN se purificaran suficientemente antes de la electroporación. Se intentó entonces la generación de ARP con colaboradores sin caperuza en otros tipos celulares (células CHO, 293T y DF-1) para confirmar que este resultado no estaba limitado a las células Vero.

Se usaron ARN colaboradores sin caperuza para generar ARP en células Vero, CHO, DF-1 y 293T. Las ARP generadas con colaboradores de ARN sin caperuza eran equivalentes en título a las ARP generadas con colaboradores de ARN con caperuza en todos los tipos celulares ensayados (Figura 1). La capacidad de usar moléculas de ARN colaboradores sin caperuza permite significativos ahorros de costes en términos de reactivos y rendimiento de ARN. En contraposición, los rendimientos eran mayores para ARN de replicón con caperuza que para ARN de replicón sin caperuza. Las caperuzas pueden incluir la caperuza G, caperuza C, caperuza A, G metilada (m7G(5'ppp(5')pppG(5)A); G no metilada (G(5'ppp(5')A); ARCA (análogo de caperuza antiinverso, 3-O-Me-m7G(5')pppG(5)); los reactivos de caperuza son bien conocidos en la materia y están comercialmente disponibles, por ejemplo, en Promega, Madison, WI y Ambion; Austin, TX. El coste de la producción de ARN disminuye significativamente debido a que el reactivo análogo de caperuza es un componente caro del proceso y porque cada reacción de transcripción procura más ARN.

Al comparar los resultados con ARN purificados y no purificados en electroporación, se determinó que era necesaria una purificación de ARN al menos parcial (usando kits comercialmente disponibles y métodos que incluyen, pero sin limitación, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía en columna de sílice o LiCl) para unos buenos rendimientos de ARP. La purificación retira moléculas tales como EDTA, HEPES y TRIS (constituyentes comunes en la manipulación de ácido nucleico), que son conocidos por causar efectos perjudiciales sobre las eficacias de transfección obtenidas por electroporación (véase, p.ej., el manual de instrucciones de Brinkmann Instruments), así como los componentes del tampón de transcripción usado para generar los ARN (véase el Ejemplo 2). Las preparaciones de ácido nucleico usadas en la electroporación están preferiblemente a una relación de A_{260}/A_{280} de aproximadamente 1,7 a 1,9 y se suspenden en agua destilada antes de la electroporación. La purificación de ARN tiene la ventaja añadida de lograr una concentración de las disoluciones de ARN. Con un menor volumen para la disolución de ARN que se va a añadir a las células en el medio de electroporación, pueden usarse más células en la electroporación. Sin desear ligarse a teoría particular alguna, se cree que la retirada del catión de Mg divalente o la reducción del catión divalente de Mg a una concentración menor de 5 mM antes de la electroporación mejora el rendimiento de ARP definitivo.

Puede usarse un único colaborador de ADN para producir ARP cuando se electropora junto con el ARN de replicón alfavírico portador de la secuencia de interés. Aunque las electroporaciones de onda cuadrada y onda exponencial daban resultados similares, cuanto mayor es la pureza del colaborador de ADN mejor es el rendimiento de ARP. Se encontró que era preferible un menor voltaje (con una mayor capacitancia) para introducir eficazmente las moléculas de ADN en las células, en comparación con introducir solo moléculas de ARN.

Después de haber recogido las ARP de las células por lavado salino, y recogido opcionalmente del sobrenadante exento de células, pueden purificarse las ARP mediante una o más etapas que incluyen, pero sin limitación, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad con heparina. La cromatografía de heparina parece funcionar con varias de las proteínas estructurales alfavíricas mutantes atenuadas incorporadas a las ARP, pero no para las proteínas estructurales del virus VEE 3000.

Es un alfavirus preferido para uso en la presente invención el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE). Preferiblemente, la cepa de VEE usada para producir las ARP contiene al menos una mutación atenuante. Como clase representativa de dichas mutaciones atenuantes, se diseñaron primero como mutantes "de penetración rápida" (Johnston y Smith, *Virology* 162: 437-443, 1988), muchos de los cuales se mostró después que portaban mutaciones en la glicoproteína E2 que daban como resultado una carga positiva neta (Davis *et al.*, *Virology* 183: 20-31, 1991) y conferían también una capacidad potenciada de unirse a glicosaminoglicanos, p.ej. sulfato de heparano (véanse también Klimstra, WB *et al.* 1998 72: 7357-7366; Bernard *et al.*, *Virology* 276: 93-103, 2000). Son conocidas mutaciones similares en otros alfavirus, p.ej. Sindbis (Olmsted *et al.*, *Virology* 148: 245, 1986; Davis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6771, 1986); es un mutante de VEE atenuado de unión a heparina específicamente ejemplificado la cepa 3014. Los virus o las ARP derivadas de los mismos portan mutaciones que confieren la capacidad de unión a glicosaminoglicanos y son particularmente bien adecuados para purificación usando la etapa de lavado salino, y pueden purificarse adicionalmente también usando cromatografía de afinidad con heparina.

Las células colaboradoras, en el contexto de esta invención, son células que, cuando están presentes ácidos nucleicos colaboradores y de replicón en las mismas, producen partículas de replicón alfavírico. Pueden usarse también para empaquetar ARP células en que las funciones colaboradoras están codificadas en una o más secuencias integradas establemente. Puede introducirse el ADN o ARN mediante cualquier medio conocido en la materia que sea apropiado para el tipo particular de célula, incluyendo sin limitación, transformación, lipofección o electroporación. Como alternativa, pueden usarse también las células transformadas establemente en que los genes estructurales necesarios para el empaquetamiento del ácido nucleico de replicón en partículas víricas están integrados en el genoma para preparar ARP usando los métodos dados a conocer en la presente memoria.

Se reconoce por los especialistas en la materia que las secuencias de codificación pueden variar debido a la degeneración del código genético y la utilización de codones. Están incluidas dentro del alcance de esta invención todas las secuencias sinónimas que codifican el antígeno u otro polipéptido o proteína de interés.

Adicionalmente, se reconoce por los especialistas en la materia que pueden aparecer variaciones alélicas en las secuencias de codificación que no cambien significativamente la actividad de las secuencias aminoacídicas de los

péptidos que codifican esas secuencias. Todas dichas secuencias de ADN equivalentes están incluidas dentro del alcance de esta invención y la definición de promotor.

5 Son técnicas estándares para clonación, aislamiento, amplificación y purificación de ADN, para reacciones enzimáticas que implican ADN ligasa, ADN polimerasa, endonucleasas de restricción y similares, y diversas técnicas de separación, aquellas conocidas y empleadas comúnmente por los especialistas en la materia. Se describe una serie de técnicas estándares en Sambrook *et al.* (1989) "Molecular Cloning", 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, Nueva York; Maniatis *et al.* (1982) "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, Nueva York; Wu (ed.) (1993) "Meth. Enzymol." 218, Parte I; Wu (ed.) (1979) "Meth. Enzymol." 68; Wu *et al.* (eds.) (1983) "Meth. Enzymol." 100 y 101; Grossman and Moldave (eds.) "Meth. Enzymol." 65; Miller (ed.) (1972) "Experiments in Molecular Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York; Old y Primrose (1981) "Principles of Gene Manipulation", University of California Press, Berkeley; Schleif y Wensink (1982) "Practical Methods in Molecular Biology"; Glover (ed.) (1985) "DNA Cloning" Vol. I y II, IRL Press, Oxford, UK; Hames and Higgins (eds.) (1985) "Nucleic Acid Hybridization", IRL Press, Oxford, UK; Setlow y Hollaender (1979) "Genetic Engineering: Principles and Methods", vol. 1-4, Plenum Press, Nueva York y Ausubel *et al.* (1992) "Current Protocols in Molecular Biology", Greene/Wiley, Nueva York, NY. Las abreviaturas y nomenclatura, cuando se emplearon, se consideran estándares en el campo y usadas comúnmente en revistas profesionales tales como las citadas en la presente memoria.

20 Las formulaciones farmacéuticas, tales como vacunas u otras composiciones inmunogénicas, comprenden una cantidad inmunogénica de partículas de replicón alfavírico infecciosas defectivas de propagación o partículas vivas atenuadas en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad inmunogénica" es una cantidad de partículas alfavíricas infecciosas que es suficiente para provocar una respuesta inmunitaria en el sujeto al que se administra la formulación farmacéutica. Se cree adecuada una cantidad de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^9 , especialmente de 10^6 a 10^8 , unidades infecciosas o ARP por dosis, dependiendo de la edad y la especie del sujeto que se esté tratando. Los portadores farmacéuticamente aceptables ejemplares incluyen, pero sin limitación, agua estéril exenta de pirógenos y disolución salina fisiológica estéril exenta de pirógenos. Los sujetos a los que pueden administrarse cantidades inmunogénicas de las partículas alfavíricas infecciosas defectivas de replicación incluyen sujetos humanos y animales (p.ej., perro, gato, bovino, caballo, asno, ratón, hámster, monos, conejillos de Indias, aves y huevos). La administración puede ser por cualquier medio adecuado, tal como administración intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, intranasal, intravaginal, intrarrectal, subcutánea o intravenosa.

35 Pueden incorporarse una o más moléculas inmunopotenciadoras, tales como quimiocinas y/o citocinas, a las composiciones inmunogénicas que comprenden las partículas de replicón alfavírico preparadas como se describe en la presente memoria. Como alternativa, las composiciones inmunogénicas pueden comprender partículas de replicón alfavírico que dirigen la expresión de una o más quimiocinas y/o citocinas en el paciente o animal al que se administra la composición. Las quimiocinas y/o citocinas ejemplares incluyen, sin limitación, interleucina 4, interleucina 12, interferón γ , factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos y ligando de FLT-3. Se entiende que la elección de la citocina y/o quimiocina puede variar según la neoplasia, parásito o patógeno al que está orientado la respuesta inmunitaria.

40 Las composiciones inmunogénicas que comprenden las ARP (que dirigen la expresión de la secuencia o secuencias de interés cuando se administran las composiciones a un ser humano o animal) producidas usando los métodos de la presente invención pueden formularse mediante cualquiera de los medios conocidos en la materia. Dichas composiciones, especialmente vacunas, se preparan típicamente como inyectables, en forma de disoluciones o suspensiones líquidas. Pueden prepararse también formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes de la inyección. Son también adecuadas preparaciones liofilizadas.

45 Los ingredientes inmunogénicos activos (las ARP) se mezclan a menudo con excipientes o portadores que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, agua estéril, disolución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos, así como estabilizantes, p.ej. HSA u otras proteínas y azúcares reductores adecuados.

50 Además, si se desea, las vacunas pueden contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH y/o coadyuvantes que potencien la eficacia de la vacuna. Los ejemplos de coadyuvantes que pueden ser eficaces incluyen, pero sin limitación: hidróxido de aluminio, *N*-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP); *N*-acetilnormuramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, a la que se hace referencia como nor-MDP), *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanin-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)etilamina (CGP 19835A, a la que se hace referencia como MTP-PE) y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias: monofosforil-lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno/Tween 80 al 2 %. Puede determinarse la eficacia de un coadyuvante midiendo la cantidad de anticuerpos dirigidos contra el producto inmunogénico de la ARP resultante de la administración del inmunógeno en vacunas que comprenden también diversos coadyuvantes. Pueden usarse también dichas formulaciones y modos de administración adicionales como son conocidos en la materia.

- Se administran las composiciones inmunogénicas (o biológicamente activas de otro modo) que contienen ARP de manera compatible con la formulación de dosificación, y en aquella cantidad que sea profiláctica y/o terapéuticamente eficaz. La cantidad para administrar, que está generalmente en el intervalo de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^9 unidades infecciosas por ml en una dosis, depende del sujeto para tratar, la vía mediante la que se administran la ARP, la inmunogenicidad del producto de expresión, los tipos de respuestas inmunitarias efectoras deseadas y el grado de protección deseado. Las cantidades precisas de ingrediente activo necesarias para administrar pueden depender del criterio del médico, veterinario u otro profesional sanitario y pueden ser características de cada individuo, pero dicha determinación está dentro de las habilidades de dicho profesional.
- La vacuna u otra composición inmunogénica pueden procurarse en un programa de dosis única o dosis múltiples. Es un programa de dosis múltiples aquel en que el curso primario de vacunación puede incluir de 1 a 10 o más dosis separadas, seguido de otras dosis administradas en intervalos temporales posteriores según sea necesario para mantener y/o reforzar la respuesta inmunitaria, p.ej. semanalmente o al cabo 1 a 4 meses para una segunda dosis y, si es necesario, una o varias dosis posteriores después de varios meses/años.
- Se proporcionan los siguientes ejemplos con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la invención como se reivindica en la presente memoria. Se pretende que cualquier variación en los artículos y métodos ejemplificados que se le ocurra al especialista entre dentro del alcance de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Parámetros de ARN que afectan al rendimiento de ARP

- A. Uso de ARN colaboradores sin caperuza en diversos tipos celulares

Células 293T

- Se hicieron crecer células 293T en medio DMEM con FBS al 10 %. Se efectuó la electroporación en una cubeta de 0,4 cm de paso con un electroporador de onda cuadrada BTX (Modelo 830; Genetronics, Inc., San Diego, CA) usando $4,8 \times 10^7$ células en PBS y 30 μg de cada uno de los siguientes tres ARN (purificados usando el kit RNeasy Midi n° 75142, Qiagen Corp., Valencia, CA): colaborador de cápsida de VEE, colaborador de glicoproteína de VEE y replicón de GFP de VEE. Se prepararon los ARN colaboradores mediante transcripción *in vitro* con ("con caperuza") o sin ("sin caperuza") la adición de nucleótido con caperuza G en la reacción de transcripción. En las reacciones que incluían el análogo de caperuza, se reducía la concentración de GTPr proporcionalmente. Se usaron 4 pulsos a 360 V con una longitud de pulso de 450 μs . Después de la electroporación, se sembraron las células en matraces T-75 que contenían 25 ml de medios. Se recolectaron las ARP de los medios y se titularon en células Vero.

Células CHO

- Se hicieron crecer células CHO en medio F-12 con FBS al 10 %. Se efectuó la electroporación en un electroporador de onda cuadrada BTX usando $1,2 \times 10^7$ células en PBS y 30 μg de cada uno de los siguientes tres ARN: colaborador de cápsida de VEE, colaborador de glicoproteína de VEE y replicón de GFP de VEE. Se usaron cuatro pulsos a 580 V con una longitud de pulso de 450 μs . Después de la electroporación, se sembraron las células en matraces T-75 que contenían 25 ml de medios. Se recolectaron las ARP de los medios y se titularon en células Vero.

DF-1 (pollo)

- Se hicieron crecer células DF-1 en medio DMEM con FBS al 10 %. Las condiciones eran como las descritas para células CHO.

Vero

Se hicieron crecer células Vero en medio EMEM con FBS al 10 %. Las condiciones eran como las descritas para células CHO.

- Se presentan los resultados en la Figura 1, que muestra las UI/ml obtenidas cuando se usan ARN colaboradores sin caperuza frente a con caperuza en los tipos celulares indicados.

B. Efecto de la purificación de ARN y la adición de caperuza sobre el rendimiento de ARP

- En un experimento que emplea un ARN de vector de replicón que codifica gag de VIH y dos ARN colaboradores que codifican los genes de cápsida y glicoproteína de VEE, se efectuaron las reacciones de transcripción *in vitro* usando un kit comercialmente disponible en Promega Corporation (Madison, WI; n° de cat. P1300). Se añadió G con caperuza a la reacción de transcripción para preparar ARN colaboradores con caperuza y de replicón, y se redujo la concentración de GTPr a 1,4 mM en comparación con los demás NTPr. Para preparar ARN colaborador sin caperuza, se usaron los cuatro NTPr a concentraciones equimolares. Se logró la purificación de ARN usando el sistema de aislamiento de ARN total Promega SV (Promega Corp., Madison, WI; n° de catálogo Z3100, una resina

de sílice) y eluyendo el ARN con agua exenta de ARNasa. Son también adecuados otros métodos de purificación de ARN, tales como cromatografía de exclusión por tamaño, pero es un parámetro clave usar un método que genere una disolución de ARN concentrada muy pura, concretamente de al menos 0,5 µg/µl, preferiblemente al menos 2-3 µg/µl. Se determinaron las concentraciones de los ARN purificados usando un espectrofotómetro, mientras que se estimó la concentración de ARN no purificados (obtenidos usando la reacción de transcripción directamente) operando con una alícuota de 1 µl en gel de formaldehído con alícuotas de cantidades de ARN conocidas.

Se electroporaron cantidades iguales de cada uno de los ARN colaboradores, 5 o 30 µg, con caperuza o sin caperuza, en $1,2 \times 10^7$ células Vero en un volumen final de 800 µl usando una cubeta de electroporación de 0,4 cm de paso (4 pulsos a 580 V, 25 µF), junto con 30 µg de ARN de vector de replicón que codifica gag de VIH. Después de la electroporación, se sembraron las células en un matraz T75 con 25 ml de HyQMEM + FBS al 10 % y se incubaron durante una noche a 37 °C y 5 % de CO₂. Se recolectaron las ARP a las 24 horas, se filtraron y se titularon en células Vero. Se presentan los resultados en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros de ARN

Cantidad de ARN	¿ARN purificado?	¿ARN con caperuza?	Rendimiento de ARP
5 µg	No	Sí	$3,84 \times 10^3$
5 µg	No	No	$4,27 \times 10^2$
5 µg	Sí	Sí	$2,77 \times 10^5$
5 µg	Sí	No	$4,27 \times 10^3$
30 µg	No	Sí	$2,56 \times 10^4$
30 µg	No	No	$1,07 \times 10^3$
30 µg	Sí	Sí	$2,13 \times 10^6$
30 µg	Sí	No	$2,56 \times 10^6$

La purificación del ARN (tanto ARN de colaboradores como de replicón de vector) antes de la electroporación en células mejora drásticamente el rendimiento de ARP (comparar las filas 1 y 2 con 3 y 4 y las filas 5 y 6 con 7 y 8). Además, con el uso de ARN purificado, la adición de caperuza a los ARN colaboradores no es necesaria a las concentraciones de ARN mayores (comparar la fila 1 con la fila 2, 3 con 4, 5 con 6 y 7 con 8).

Se obtuvieron resultados similares usando ARN colaborador o colaboradores sin caperuza con un vector de replicón alfavérico en que se insertó una secuencia que codifica PSMA (antígeno de cáncer de próstata).

Ejemplo 2. Parámetros clave en la purificación de ARN

Se prepararon ARN de replicón y colaborador como se describe en el Ejemplo 1. Para electroporación, se combinaron 30 µg de cada ARN de replicón y colaborador en tubos de microcentrífuga exentos de ARNasa. Los tubos de control tenían ARN purificados o no purificados solos, mientras que los tubos restantes recibieron adicionalmente tampón de reacción de transcripción 5x [HEPES-KOH 400 mM (pH 7,5); MgCl₂ 120 mM; espermidina 10 mM y DTT 200 mM), enzima de restricción Not I, mezcla enzimática T7 (ARN polimerasa dependiente de ARN de T7, inhibidor de ARNasa, pirofosfatasa) o combinaciones de estos tres. Las concentraciones finales de cada componente de la reacción de transcripción eran aproximadamente equivalentes a la de un volumen igual de ARN no purificado. Se añadieron $1,2 \times 10^7$ células Vero a cada tubo de microcentrífuga y se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación de 0,4 cm de paso. Se sometieron a pulsos las células 4 veces a 580 V y 25 µF y se dejaron recuperar a temperatura ambiente durante 10 min. Se sembraron las células electroporadas en matraces T75 que contenían 25 ml de HyQMEM con suero fetal bovino al 10 % y antibióticos. Se sembraron alícuotas en placas de 96 pocillos para análisis de las eficacias de electroporación.

Se fijaron células Vero en placas de 96 pocillos con MeOH y se analizó la expresión de proteína de replicón o colaborador mediante ensayo de inmunofluorescencia (IFA). Las eficacias de los ARN purificados eran mayores del 90 % para los tres ARN, mientras que las eficacias de los controles de ARN no purificados eran de 50 % o menos. La adición de Not I o mezcla enzimática T7 sola a ARN purificados tenía de poco a ningún efecto sobre las eficacias de electroporación. La adición de tampón de transcripción solo o en combinación con otros componentes de la reacción de transcripción disminuía las eficacias de electroporación al 10 % o menos.

Se recogió el medio de cultivo de matraces T7 y se filtró para retirar los desechos celulares. Se determinó el rendimiento de ARP de cada electroporación titulando en células Vero en placas de 96 pocillos. Como se muestra en la Tabla 2, los rendimientos de ARP usando ARN no purificados disminuyeron en dos unidades logarítmicas en

comparación con los rendimientos usando ARN purificados. Not I o la mezcla enzimática T7 no tenían un efecto significativo sobre los rendimientos de ARP cuando se añadían a ARN purificados solos; sin embargo, la adición de tampón de reacción de transcripción de T7 en cualquier combinación daba como resultado una disminución de 4 unidades logarítmicas o mayor de los rendimientos de ARP en comparación con ARN purificados.

- 5 Estos resultados sugieren que uno o más componentes del tampón de la reacción de transcripción pueden tener un efecto negativo sobre las eficacias de electroporación y en última instancia sobre el rendimiento de ARP. La disminución significativa de los rendimientos de ARP cuando se añade tampón de transcripción de T7 a ARN purificado en comparación con ARN no purificados que contienen tampón de transcripción de T7 sugiere que el efecto es cuantitativo, puesto que la concentración de componentes del tampón era mayor en la muestra de ARN purificado.

Tabla 2. Efecto de la manipulación de ARN sobre el rendimiento de ARP

ARN	Componente de transcripción <i>in vitro</i>	Rendimiento de ARP
Purificado	Ninguno	$1,4 \times 10^7$
No purificado	Ninguno	$1,1 \times 10^5$
Purificado	1x tampón	LDD*
Purificado	Enzima Not I	$1,9 \times 10^7$
Purificado	Mezcla enzimática T7	$3,2 \times 10^6$
Purificado	1x tampón + enzima Not I	LDD
Purificado	1x tampón + mezcla enzimática T7	LDD
Purificado	Enzima Not I + mezcla enzimática T7	$1,4 \times 10^7$
Purificado	1x tampón, Not I, mezcla enzimática T7	LDD

*LDD= en o por debajo del límite de detección (aprox. $2,1 \times 10^3$ ARP/ml)

Ejemplo 3. Efecto de las condiciones de electroporación sobre el rendimiento de ARP

- 15 En experimentos iniciales con la electroporación de ciertas estirpes celulares para electroporación, por ejemplo con células 293T y CEF, se observó que podían obtenerse mayores rendimientos de ARP aumentando la concentración de células en la mezcla de electroporación, manteniendo la misma cantidad de ácidos nucleicos de aporte.

A. Experimento 1

- 20 Se resuspendieron células Vero a la concentración indicada en PBS en una cubeta de 0,4 cm de paso, con 30 μg de ARN de replicón (que codifica un antígeno de tumor canceroso), 26,8 μg de colaborador de ARN de cápsida de VEE y 55,6 μg de colaborador de ARN de glicoproteína de VEE. Después de la electroporación, se sembraron las células en uno o más matraces, según fuera necesario, a una densidad de $1,4 \times 10^5$ células/cm² de área de crecimiento con aproximadamente 0,3 ml de medios de crecimiento por cm². 23 horas después de la electroporación, se recogieron los medios de cada matraz y se lavaron las monocapas celulares con aproximadamente 10 ml de medios exentos de suero. Se añadió esta disolución de lavado a los medios recogidos de cada matraz. Se efectuó entonces un lavado salino en cada matraz usando NaCl 0,5 M durante 10 minutos. Se recogió el lavado salino y se analizó separadamente. Cuando estuviera indicado, se efectuó un segundo lavado salino y se analizó separadamente. Se presentan en la Tabla 3 los rendimientos de ARP como el número total de partículas obtenidas de una única cubeta de electroporación.

Tabla 3. Parámetros de lavado y rendimiento de ARP

Concentración celular en células/ml; unidad relativa	Volumen de medios o lavado salino	Rendimiento de ARP	Rendimiento de ARP total (lavado salino + medios)
3×10^7 2x	50 ml de medios	$9,0 \times 10^7$	
	10 ml de lavado salino	$6,9 \times 10^8$	$7,8 \times 10^8$
9×10^7 6x	150 ml de medios	$6,2 \times 10^8$	

Concentración celular en células/ml; unidad relativa	Volumen de medios o lavado salino	Rendimiento de ARP	Rendimiento de ARP total (lavado salino + medios)
	30 ml de lavado salino n° 1	$1,1 \times 10^9$	
	30 ml de lavado salino n° 2	$4,5 \times 10^8$	$2,2 \times 10^9$
$1,2 \times 10^8$ 8x	225 ml de medios	$3,2 \times 10^8$	
	30 ml de lavado salino n° 1	$2,4 \times 10^9$	
	30 ml de lavado salino n° 2	$1,2 \times 10^9$	$3,9 \times 10^9$
$1,5 \times 10^8$ 10x	300 ml de medios	$4,8 \times 10^8$	
	60 ml de lavado salino n° 1	$3,8 \times 10^9$	
	60 ml del lavado salino n° 2	$1,4 \times 10^9$	$5,7 \times 10^9$

Por tanto, un aumento de 5 veces de la concentración celular, sin ningún aumento de la cantidad de ARN usada en la electroporación, da como resultado un aumento de casi 10 veces del rendimiento de ARP.

B. Empaquetamiento de ARP con un único colaborador de ADN

- 5 Se resuspendieron células Vero en medio exento de suero InVitrus a las densidades celulares indicadas. Se electroporaron las células usando 30 μg de un ARN de replicón de gag de VIH de VEE y 100-150 μg de colaborador de ADN de VEE que expresa todas las proteínas estructurales de VEE bajo un promotor CMV. Se purificó el colaborador de ADN y se concentró a al menos 5 mg/ml antes de usar en electroporación.

- 10 Después de la electroporación, se incubaron las células durante 10 minutos a temperatura ambiente y se transfirieron entonces a 4 ml de OptiPro, que se dividió entonces equitativamente en dos matraces T300 que contenían cada uno 100 ml de OptiPro. Se incubaron las células durante una noche a 37 °C y 5 % de CO₂. Se recolectaron las ARP aspirando en primer lugar los medios de las células y pasándolos a través de un filtro de 0,2 μm a un envase estéril. Se lavaron las células en el matraz durante 5 minutos a temperatura ambiente con 10 ml de una disolución de NaCl 1 M en NaPi 20 mM, pH 7,2-7,4. Se transfirió el lavado salino al filtro usado y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se pasó este lavado salino a través del filtro a un envase limpio y separado de los medios. Se mantuvieron y titularon separadamente medios y lavado salino. Las UI totales, reseñadas en la Tabla 4, representan la suma de lavado salino y medios; generalmente, los medios contenían un número insignificante de ARP en comparación con el lavado salino. Se obtuvieron resultados similares usando una disolución de lavado salino de NaCl 0,5 M.

20 C. Experimento 3

- Se usó un Cell Cube de Corning (Corning, Inc., Acton, MA) para hacer crecer una gran cantidad de células. Se efectuó una única electroporación usando 5×10^8 células Vero en una cubeta de electroporación de 1 cm de paso. Se electroporaron 150 μg de cada uno de replicón de VEE (que codifica gag de VIH), colaborador de cápsida de VEE y colaborador de glicoproteína de VEE en las células usando 4 pulsos a 1150 V, 25 μF en un electroporador Bio-Rad (Gene Pulser II, BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA; n° de catálogo 165-2105). Después de la electroporación, se sembraron las células en 5 matraces T-300 que contenían 100 ml de OptiPro SFM (Invitrogen, Carlsbad, CA; n° de catálogo 12309019). 24 horas después de la electroporación, se recogieron los medios de cada matraz y se combinaron para titulación. Se efectuó entonces un lavado salino en cada matraz usando 20 ml de NaCl 1,0 M en cada matraz, y se combinaron los lavados salinos para titulación. El rendimiento total de ARP en los medios era de 1×10^8 u.i.; el rendimiento total de ARP en el lavado salino era de $2,2 \times 10^{11}$ u.i.

Ejemplo 4. Parámetros de cultivo después de electroporación

A. Medio de crecimiento después de electroporación

- En los informes anteriores de producción de ARP, se siembran las células en medio que contiene FBS al 10 % después de la electroporación. Para examinar los efectos del suero sobre el rendimiento de ARP, se sembraron células en diferentes medios con concentraciones variables de suero. Un medio después de electroporación óptimo

no requeriría el uso de suero y tendría una baja concentración de proteína. Se examinaron los medios con contenidos rebajados de suero así como tres medios exentos de suero para uso en electroporaciones de alta densidad celular: medio exento de suero OptiPro, Gibco Cell Culture/Invitrogen, San Diego, CA; VP-SFM, medio exento de suero VP, Gibco Cell Culture/Invitrogen, San Diego, CA; Ex-Cell 505, JRH Biosciences, Lenexa, KS y medio de cultivo celular definido químicamente InVitrus, (Cell Culture Technologies GmbH, Zurich, CH; n° de catálogo IVT). Todos estos medios tienen un pH tamponado entre 7,0 y 7,4. Se electroporaron células Vero con ARN colaborador y de replicón. Se dividió la mezcla de electroporación entre 8 matraces T-75 que contenían diferentes medios. Se cultivaron las células durante 18-24 horas a 37 °C. El análisis de los rendimientos de ARP reveló que pueden reducirse los niveles séricos en EMEM de 10 a 1 % sin disminución significativa de los rendimientos de ARP. También el medio OptiPro dio rendimientos de ARP equivalentes a aquellos en EMEM + FBS al 10 %. OptiPro, que está exento de proteínas humanas y/o animales, dio rendimientos de ARP equivalentes a los obtenidos usando EMEM + FBS al 10 % para varias ARP diferentes. Los medios exentos de suero útiles para el crecimiento después de la electroporación incluyen varios medios comercialmente disponibles.

B. Efecto del pH del medio de crecimiento después de la electroporación

Se examinó también el efecto del pH del medio de crecimiento después de la electroporación sobre el rendimiento de ARP. Se electroporaron células Vero en un aparato de electrodo de placa Petri y se inocularon alícuotas en medio de crecimiento completo ajustado al pH de interés. Se muestran los resultados en la Figura 4.

C. Cartuchos de fibra hueca para crecimiento celular después de la electroporación

Se ha descubierto que las células electroporadas se adhieren súbitamente a fibras de polisulfona, tales como aquellas del cartucho FiberCell HF (FiberCell Systems, Inc.; Frederick, MO; n° de catálogo: 4300-C2011). Disponer las células electroporadas en una fibra hueca proporciona ventajas para recolectar las ARP producidas por las células en las fibras huecas. El volumen final en que pueden eluirse las ARP puede ser tan bajo como de 40 ml (usando un cartucho pequeño que puede contener 10^9 células) a 100 ml (cartucho mayor que puede contener 5×10^{10} células).

Tabla 4. Densidad celular y rendimiento de ARP

Densidad de células Vero en la cubeta de electroporación (células/ml)	Rendimiento de ARP (UI totales)
$2,5 \times 10^7$	$6,5 \times 10^8$
$5,0 \times 10^7$	$9,5 \times 10^8$
$7,5 \times 10^7$	$3,6 \times 10^9$
$1,0 \times 10^8$	$3,45 \times 10^9$
$1,3 \times 10^9$	$6,4 \times 10^9$

Ejemplo 5. Efecto de la concentración de ARN colaborador sobre los rendimientos de ARP

Se efectuó la electroporación en una cubeta de 0,4 cm de paso usando 1×10^8 células Vero. Cada electroporación incluía 30 µg de cada uno de ARN de replicón de VEE de gag de VIH y colaborador de glicoproteína de VEE; la concentración de colaborador de cápsida de VEE variaba como se indica. Se efectuó la electroporación en un instrumento Bio-Rad usando las siguientes condiciones: 4 pulsos a 580 V, 25 µF (longitud de pulso resultante: aprox. 0,8 ms). Se sembraron las células en 50 ml de EMEM + FBS u OptiPro, como se indica, en matraces T175. 24 horas después de la electroporación, se recolectó el medio de cada matraz y se filtró. Se añadieron 5 ml de NaCl 1 M a cada matraz y se dejaron incubar con las células adheridas durante 5 minutos. Se retiró entonces la disolución de lavado salino y se filtró a través del mismo filtro usado para el medio anteriormente recogido.

Tabla 5. Concentración de ARN, medio y rendimiento de ARP

	Medios	Lavado salino
30 µg de ARN de cápsida/EMEM + FBS	$2,20 \times 10^9$	$9,70 \times 10^{10}$
30 µg de ARN de cápsida/Optipro	$2,12 \times 10^9$	$9,10 \times 10^{10}$
90 µg de ARN de cápsida/Optipro	$3,12 \times 10^9$	$7,70 \times 10^{10}$
80 µg de ARN de cápsida/Optipro	$4,80 \times 10^8$	$8,00 \times 10^{10}$

	Medios	Lavado salino
30 µg de ARN de cápsida truncado/Optipro	$1,50 \times 10^9$	$9,00 \times 10^{10}$
90 µg de ARN de cápsida truncado/Optipro	$2,36 \times 10^9$	$8,30 \times 10^{10}$

Ejemplo 6. Colaborador de ADN y condiciones de electroporación

Típicamente, se necesitan cantidades mayores de ADN y condiciones de electroporación algo diferentes para obtener la electroporación eficaz de colaboradores de ADN en células Vero, en comparación con las cantidades y condiciones usadas para colaboradores de ARN. Por ejemplo, se electroporan los colaboradores de ADN usando 250 V, 950 µF o 2-3 pulsos (30 ms) a 250 V, 800 µF, mientras que se electroporan los colaboradores de ARN usando 580 V, 25 µF (cuatro pulsos).

Como con el ARN, el colaborador de ADN (o colaboradores) se purifican deseablemente antes de la electroporación. Se llevó a cabo la electroporación en una cubeta de electroporación de 0,4 cm de paso con 1×10^8 células Vero y un único colaborador de ADN que codifica todas las proteínas estructurales de VEE usando dos dispositivos de electroporación diferentes. La primera máquina proporciona un pulso de voltaje inicial que decae exponencialmente. Usando 100 o 150 µg de ADN (de una disolución purificada a una concentración de al menos 5 mg/ml), es un conjunto útil de condiciones un único pulso a 250 V, 950 µF, que suministra un pulso de aproximadamente 20 a 30 ms. La capacitancia puede reducirse, p.ej. a 800 µF, y 2-3 pulsos a 250 V proporcionan aproximadamente el mismo rendimiento de ARP. En una segunda máquina que suministra el voltaje en forma de una onda cuadrada, un pulso de entre 20 y 50 ms a 300 V proporcionó resultados similares a la primera máquina. Este procedimiento puede optimizarse para todos los tipos celulares variando longitud de pulso, forma, voltaje, capacitancia y número. Las células Vero típicamente no sobreviven a un pulso de 25 ms superior a 400 V. Puesto que estas condiciones son más duras que las necesarias para suministrar el ARN de replicón de vector, se electroporan las partículas preparadas usando un colaborador de ADN en las condiciones optimizadas para ADN, y el ARN de replicón de vector entra en las células eficazmente en estas condiciones.

Se electroporaron 10^8 células en 0,8 ml usando 30 µg de un ARN de replicón de gag de VIH de VEE y 150 µg de colaborador de ADN de VEE que expresa todas las proteínas estructurales de VEE bajo el control regulador de un promotor CMV. Después de la electroporación, se manipularon las células, se recogieron las ARP, se titularon como se describe anteriormente y se muestran los resultados en la tabla siguiente.

Tabla 6. Condiciones de electroporación y rendimiento de ARP

Voltaje (V)	Capacitancia (mF)	Nº de pulsos	UI totales
250	950	1	$5,2 \times 10^6$
300	"	1	$3,9 \times 10^6$
350	"	1	$2,9 \times 10^6$
400	"	1	0
450	"	1	0
"	"	1	0
250	800	2	$5,2 \times 10^6$
"	"	3	$4,3 \times 10^6$
350	650	2	0
"	"	3	$1,4 \times 10^6$
250	950	2	$4,7 \times 10^6$

Se observa que, en el experimento para el que se presentan los datos anteriores, se cree que la pureza insuficiente de la preparación de colaborador de ADN es responsable de los rendimientos globales relativamente bajos, pero estos datos documentan los efectos relativos de los parámetros de electroporación.

Ejemplo 7. Sincronización de células para la producción de ARP

Se examinó el efecto de sincronizar células en la fase G2/M del ciclo celular sobre la eficacia de electroporación. Se trataron las células 2 horas después de plantar con afidicolina 1 µg/ml en DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) durante 20 h, se dejaron reposar durante 4 h y se recolectaron para electroporación (Golzio *et al.* (2002) Biochem. Biophys. Acta 1563: 23-28). Se llevaron a cabo las electroporaciones de ADN colaborador (junto con ARN de replicón) como se describe en la presente memoria. Se observó el crecimiento y morfología celular de las células a lo largo del proceso de tratamiento. Con cada grupo de células, se llevó un matraz que contenía el tratamiento de control con DMSO con los matraces tratados con afidicolina/DMSO. No había efectos negativos sobre la salud general de las células durante el tratamiento en los matraces de prueba o control. Se determinó que era beneficioso obtener la confluencia al cabo de una incubación de 2 h antes de empezar el protocolo de sincronización. La laminación celular era mejor a 90-100 % antes del inicio del tratamiento con afidicolina porque se evitaba la división celular posterior por el tratamiento. Usando células Vero, se encontró que una densidad de $4,0 \times 10^5$ células/cm² era demasiado alta; una densidad celular de $1,1 \times 10^4$ células/cm² daba como resultado un 90 % de confluencia a las 2 h.

Ejemplo 8. Disoluciones prelavado y rendimientos de ARP

Después de producir las ARP por las células electroporadas, pueden lavarse extensamente las células con una disolución de lavado celular para retirar los materiales externos antes de empezar la recolección de ARP. La elección de la disolución de lavado celular afecta al número de ARP liberadas durante esta etapa prelavado.

Se efectuó una única electroporación en una cubeta de 0,4 cm de paso usando 1×10^8 células Vero y 30 µg de cada uno de ARN de replicón de gag de VIH de VEE, ARN colaborador de cápsida de VEE y ARN colaborador de glicoproteína de VEE. Se sembraron las células igualmente en 8 matraces T75, conteniendo cada uno 25 ml de medios OptiPro. Después de 24 horas, se retiraron los medios, se lavaron las monocapas celulares con 6 ml de la disolución de lavado celular indicada y se lavaron finalmente las células con 6 ml de NaCl 1 M (fosfato tamponado a pH 7,2). Se analizó separadamente en medios, lavado celular y disoluciones de lavado salino el rendimiento de ARP titulando en células Vero. Se presentan los resultados en la Figura 4.

Ejemplo 9. Parámetros de lavado salino

A. Composición salina

Se llevó a cabo la electroporación en una cubeta de 10 mm de paso usando 5×10^8 células Vero, 150 µg de cada uno de ARN de replicón de gag de VIH de VEE, ARN colaborador de cápsida de VEE y ARN colaborador de glicoproteína de VEE. Se efectuó la electroporación usando 4 pulsos a 1150 V, 25 µF. Se sembraron las células electroporadas igualmente entre 40 matraces T-75. Se recolectó un matraz a las 16 horas, se realimentó con medio reciente y se recolectó a las 24 horas después de la electroporación. Se recolectaron los demás matraces a las 24 horas. Se retiraron los medios de cada matraz y se añadieron 5 ml de la disolución de lavado salino indicada a cada matraz y se incubaron durante 5 minutos. Se retiró entonces la disolución de lavado salino y se tituló. Se muestran en la Figura 5 los resultados obtenidos usando estas diferentes disoluciones de lavado. La cantidad de ARP (medida por titulación) liberadas en el medio de crecimiento a partir de las células está levemente afectada por el pH en el intervalo de pH 7,0-8,0 (véase la Figura 3).

B. Concentración salina en el medio de liberación

Tabla 7. Parámetros de lavado salino

Concentración de NaCl en el medio de liberación	Temperatura del medio (° C)	Rendimiento de ARP
5 M	4	$3,7 \times 10^8$
5 M	TA	$4,45 \times 10^8$
5 M	37	$3,5 \times 10^8$
2,5 M	4	$3,1 \times 10^8$
2,5 M	TA	$3,55 \times 10^8$
2,5 M	37	$4,60 \times 10^8$
1 M	4	$4,05 \times 10^8$
1 M	TA	$3,75 \times 10^8$
1M	37	$4,35 \times 10^8$
0,5 M	4	$3,45 \times 10^8$
0,5 M	TA	$3,84 \times 10^8$

Ejemplo 10. Purificación de ARP

Las ARP pueden purificarse mediante cromatografía de afinidad usando diversas resinas. Generalmente, puede usarse un intervalo de condiciones de elución, dependiendo de la resina elegida, teniendo cuidado de no someter las ARP a un pH menor de aproximadamente 6. Se observa que el antígeno codificado por el ARN de replicón se incorpora habitualmente a las ARP; las propiedades del antígeno pueden afectar al comportamiento de las ARP durante la purificación. El especialista sabe cómo reconocer dichos efectos y modificar el procedimiento de purificación de ARP en consecuencia.

A. Cromatografía de afinidad con heparina

Se diluyen las ARP en una disolución de lavado salino con fosfato de sodio 5 mM, pH 7,4, hasta un contenido de cloruro de sodio de 0,12 M o menos. Se carga entonces la disolución en una columna que contiene resina Heparin Sepharose Fast Flow (Amersham, Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ; n° de catálogo 17-0998-01) o resina Heparin HyperD M (Biosepra, Marlboro, MA) a una velocidad lineal de 100 cm/h o menos. Por ejemplo, las ARP de VEE 3014 eluyen a una concentración de cloruro de sodio de aproximadamente 0,3 M a pH 7,4. Se recogen las ARP de VEE 3014 y se formulan mediante dilución directa o mediante diafiltración. Son rendimientos típicos para las ARP purificadas mediante este procedimiento del 70 %. Pueden usarse gradientes salinos por etapas o lineales para eluir las ARP.

La mayoría de contaminantes del suero y de las células Vero se reducen por la etapa de cromatografía de heparina; la mayoría de dichos contaminantes no se unen a la resina.

B. Cromatografía de afinidad con sulfato de Cellufine

Se diluyen las ARP en una disolución de lavado salino con fosfato de sodio 5 mM, pH 7,4, a un contenido de cloruro de sodio de 0,25 M o menos. Se carga entonces la disolución en una columna que contiene resina de sulfato de Cellufine (Millipore) con gradiente de contenido creciente de cloruro de sodio. Las ARP eluyen a una concentración de cloruro de sodio de aproximadamente 0,7 M a un pH de 7,4. Se recolectan la ARP y se formulan mediante dilución directa o diafiltración. Son rendimientos típicos para ARP purificadas mediante este método de 85 %.

C. Cromatografía de interacción hidrófoba

Se diluyen las ARP en una disolución de lavado salino con NaCl 5 M/fosfato de sodio 20 mM a pH 7,4 hasta una concentración final de NaCl 3 M. Se cargan las ARP en una columna que contiene resina Toyopearl phenyl 650-M a una velocidad lineal de 100 cm/h y se eluyen con un gradiente lineal de cloruro de sodio de 3 a 0 M. La recuperación de ARP mediante este método es de aproximadamente un 77 %.

D. Cromatografía de intercambio aniónico

Se cargan las ARP directamente, o después de una dilución adecuada, sobre resina de intercambio aniónico, por ejemplo Toyopearl superQ o Amersham Q Sepharose, o en membranas de intercambio aniónico, por ejemplo Mustang Q (Pall Trincor, Exton, PA). Los materiales de cromatografía Q se basan en aminas cuaternarias para unir grupos ácidos a materiales pasados sobre ellas. Se manipulan las condiciones de carga para proporcionar la unión o circulación de muchos tipos de ARP, estando influidas las propiedades de unión por la proteína de interés expresada codificada por el vector de replicón alfavírico y expresada en las células en que se producen las ARP. En ciertos casos, la resina de intercambio aniónico es suficiente para que una única etapa de purificación dé como resultado la reducción de las proteínas séricas, proteínas de célula hospedadora y ADN. Las propiedades de unión a ARP en una resina dada son función de la resina elegida, la especie de ARP y el pH y contenido salino de la disolución portadora de la preparación de ARP.

Por ejemplo, cuando la proteína Musoke de Marburg (una glicoproteína) es el antígeno de interés codificado y la proteína de cubierta de ARP es la proteína de cubierta de VEE 3014, se recolectan las ARP usando el procedimiento de lavado salino. Se carga directamente el material de lavado salino (preparación de ARP) en la membrana Mustang Q. Se pasan las proteínas del material de lavado salino a través de la membrana y se lava la membrana con NaCl 0,5 M, fosfato de sodio 10 mM, para eluir cualquier ADN. Se eluyen entonces las ARP usando un gradiente por etapas, con elución con NaCl 1,5 M, fosfato de sodio 10 mM.

Ejemplo 11. Efecto de diferentes colaboradores de cápsida

Se resuspendieron células AlphaVax WCB p146 en PBS a $1,6 \times 10^8$ células/ml. Para las electroporaciones 1-4, el ARN de replicón (con la secuencia de codificación de gD de herpesvirus) tenía una caperuza G y se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño. Los ARN colaboradores no tenían caperuza y se purificaron por precipitación con LiCl para las electroporaciones 1-3. Para la electroporación 4, los ARN colaboradores no tenían caperuza y se purificaron por cromatografía de exclusión por tamaño. Se mezclaron 700 μ l de células ($1,1 \times 10^8$ células) con ARN y se electroporaron en cubetas de 0,4 cm (electroporador BioRad, 580 V, 25 μ F, 4 pulsos). Se sembraron las células en dos matraces T300cm² con 100 ml de medio OptiPro en cada uno. Se recolectaron las

ES 2 552 687 T3

ARP aproximadamente 18 horas después de la electroporación en 30 ml de NaCl 0,5 M/NaPO₄ 10 mM y se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm.

Tabla 8. Relación de ARN y parámetros de cápsida

Electroporación	ARN colaborador de cápsida	Relación de ARN (en µg) de replicón:caperuza:gp	Título de ARP UI/ml	UI totales	UI por célula	Título de cápsida UI/ml	Título de gp UI/ml
1	hcap4-3	30:30:60	1,1 x 10 ⁹	3,3 x 10 ¹⁰	330	1,9 x 10 ⁵	4,9 x 10 ⁵
2	hcap4 19 nt	30:30:60	3,5 x 10 ⁸	1,1 x 10 ¹⁰	110	1,1 x 10 ⁴	2,95
3	hcap4 121 nt	30:30:60	5,1 x 10 ⁸	1,5 x 10 ¹⁰	150	1,2 x 10 ⁴	3,0 x 10 ⁵
4	hcap4-3	30:100:100	3,4 x 10 ⁸	1,0 x 10 ¹⁰	100	1,1 x 10 ⁴	1,7 x 10 ⁵

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar partículas de replicón alfavírico (ARP) portadoras de mutaciones que confieren la capacidad de unión a glicosaminoglicano en células de mamífero, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 (a) introducir un ácido nucleico de replicón alfavírico en una célula hospedadora permisiva de alfavirus, comprendiendo dicho ácido nucleico de replicón al menos una señal de empaquetamiento vírico y al menos una secuencia de codificación heteróloga expresable en dicho ácido nucleico de replicón alfavírico, en el que dicha célula hospedadora comprende al menos una función colaboradora, produciendo una célula hospedadora modificada;
- 10 (b) cultivar dicha célula hospedadora modificada en condiciones que permitan la expresión de la al menos una función colaboradora, que permite la replicación de dicho ácido nucleico de replicón alfavírico y el empaquetamiento de dicho ácido nucleico de replicón alfavírico, formando ARP;
- (c) poner en contacto las células hospedadoras modificadas después de la etapa (b) con una disolución acuosa de lavado salino que tiene una fuerza iónica de 0,5 a 5 M para liberar las ARP con capacidad de unión a glicosaminoglicano en la disolución acuosa, produciendo una disolución que contiene ARP;
- 15 (d) recoger las ARP de la disolución que contiene ARP de la etapa (c), seguido de cromatografía de afinidad con heparina.
2. El método de la reivindicación 1, en el que las ARP portadoras de mutaciones que confieren capacidad de unión a glicosaminoglicanos son cepas del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) portadoras de mutaciones en la glicoproteína E2.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la partícula de replicón alfavírico portadora de la mutación que confiere capacidad de unión a glicosaminoglicano es una partícula de replicón de VEE.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que la al menos una función colaboradora en la célula hospedadora de la etapa (a) está codificada por una secuencia de ácido nucleico integrada establemente en el genoma de dicha célula hospedadora.
5. El método de la reivindicación 1, en el que la al menos una función colaboradora en la célula hospedadora se introduce en al menos un ácido nucleico colaborador que codifica una proteína de cápsida capaz de unirse a dicho ácido nucleico de replicón alfavírico y al menos una glicoproteína alfavírica, en el que dicha glicoproteína alfavírica se asocia con dicho ácido nucleico de replicón alfavírico y dicha proteína de cápsida, en el que la al menos una molécula de ácido nucleico colaborador se introduce en la célula hospedadora junto con dicho ácido nucleico de replicón alfavírico, en el que el ácido nucleico colaborador es opcionalmente una molécula de ARN sin caperuza.
- 25 6. El método de la reivindicación 1, en el que la al menos una función colaboradora está codificada por al menos dos moléculas de ácido nucleico colaborador, en el que cada una de dichas dos moléculas de ácido nucleico colaborador codifica al menos una función colaboradora vírica, en el que las moléculas de ácido nucleico colaborador son opcionalmente moléculas de ARN sin caperuza.
- 30 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el ácido nucleico colaborador es una molécula de ARN sin caperuza.
8. El método de la reivindicación 1, en el que la al menos una función colaboradora está codificada en una molécula de ADN.
9. El método de la reivindicación 5 o 6, en el que la función colaboradora está codificada en una única molécula colaboradora de ADN que codifica todas las proteínas estructurales alfavíricas.
- 40 10. El método de la reivindicación 9, en el que la concentración de la molécula colaboradora de ADN es de al menos 100 µg/ml.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la sal en la disolución de lavado salino se selecciona del grupo consistente en NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, acetato de NH₄ y bicarbonato de NH₄.
- 45 12. El método de la reivindicación 1, en el que, en la etapa (a), se introduce un ácido nucleico de replicón alfavírico en dicha célula hospedadora por electroporación.
13. El método de la reivindicación 12, en el que las células hospedadoras están presentes en una mezcla de electroporación a una concentración de 5x10⁷ a 5x10⁸ por ml.
- 50 14. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una etapa de lavado celular, antes de la etapa (c) de la reivindicación 1, en el que la disolución de lavado no contiene sal y comprende adicionalmente desoxirribonucleasa.

- 15.** El método de la reivindicación 6, en el que están presentes un ARN de replicón alfavírico y una primera molécula de ARN colaborador y una segunda molécula de ARN colaborador en una mezcla de electroporación a una relación de 1:0,3:0:0,3 a 1:20:20.
- 16.** El método de la reivindicación 15, en el que la relación es de 1:0,5:0,5 o 1:5:5.
- 5 **17.** El método de la reivindicación 1 en el que, en la etapa (a), el ácido nucleico de replicón alfavírico comprende un vector de replicón alfavírico y se introducen una o más moléculas de ácido nucleico colaborador en células hospedadoras permisivas de alfavirus por electroporación, en el que la concentración de las células hospedadoras permisivas de alfavirus en el medio de cultivo durante la electroporación es de 5×10^7 a 5×10^8 células/ml, y en el que la concentración de vector de replicón de ARN alfavírico añadido a las células antes de la
- 10 **18.** El método de la reivindicación 12 o 17, en el que, en la etapa (a), se lleva a cabo la electroporación en una cámara de electroporación caracterizada por un paso entre electrodos de entre 0,4 y 1,0 cm.
- 19.** El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células hospedadoras permisivas de alfavirus son células de mamífero cultivadas, opcionalmente células Vero.
- 15 **20.** El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la partícula de replicón alfavírico es una partícula de replicón alfavírico atenuado.
- 21.** El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la partícula de replicón alfavírico es de virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) cepa 3014.

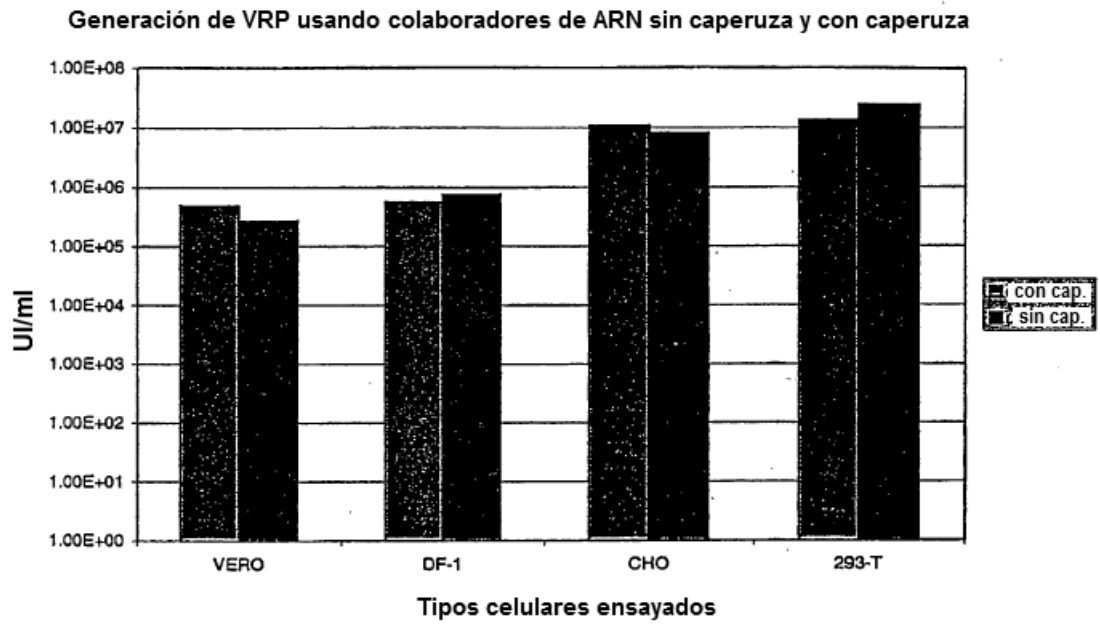


FIG. 1

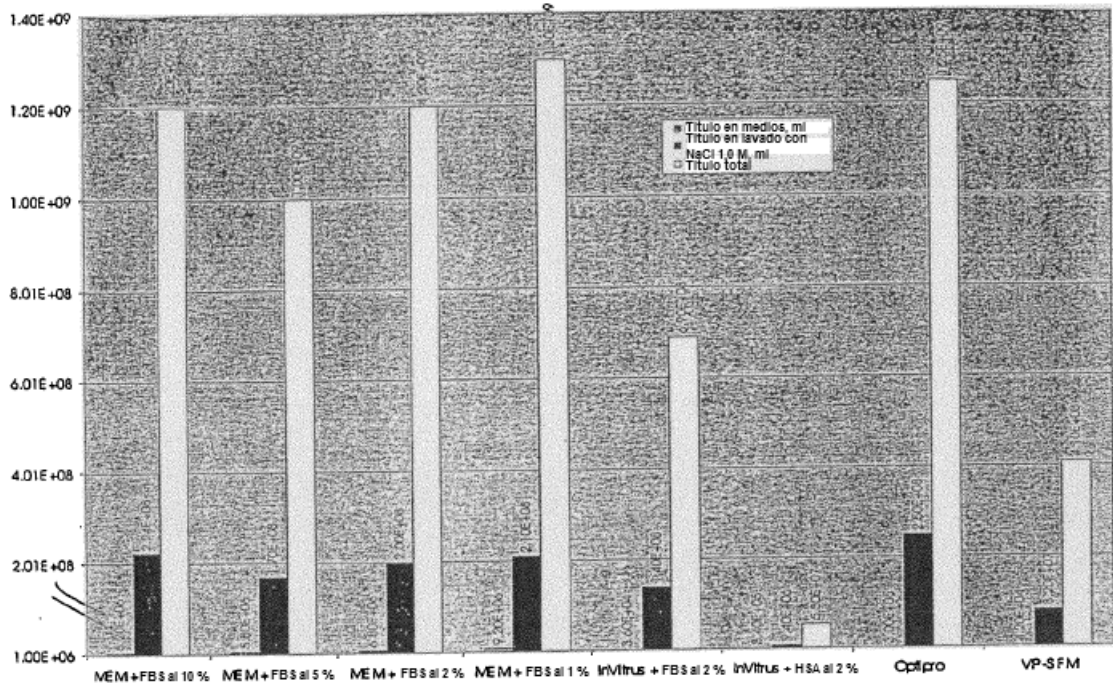


FIG. 2

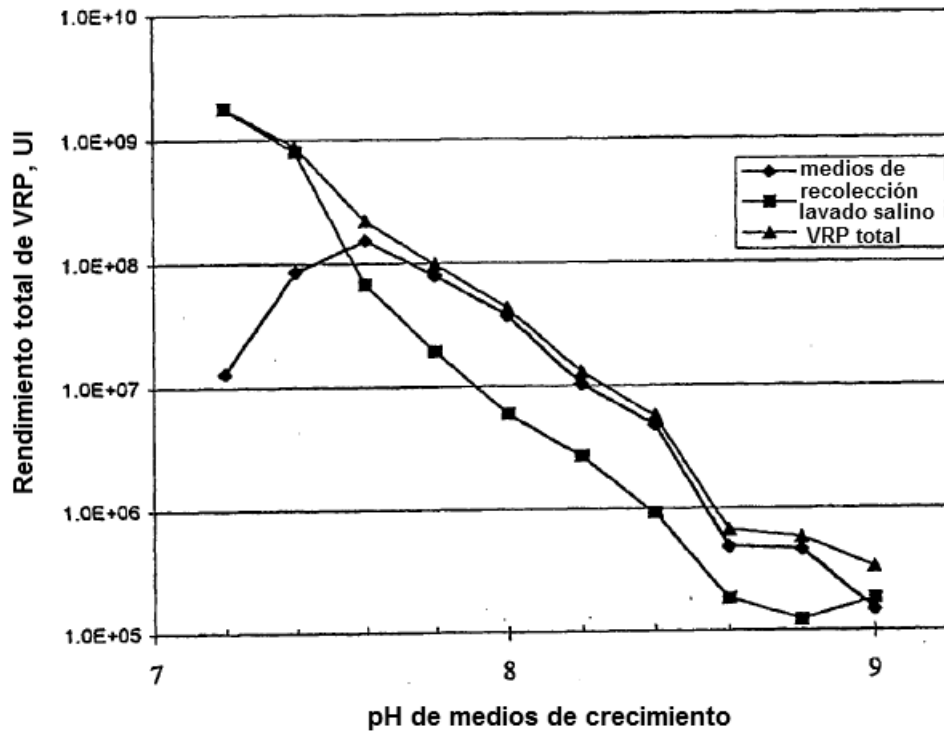


FIG. 3

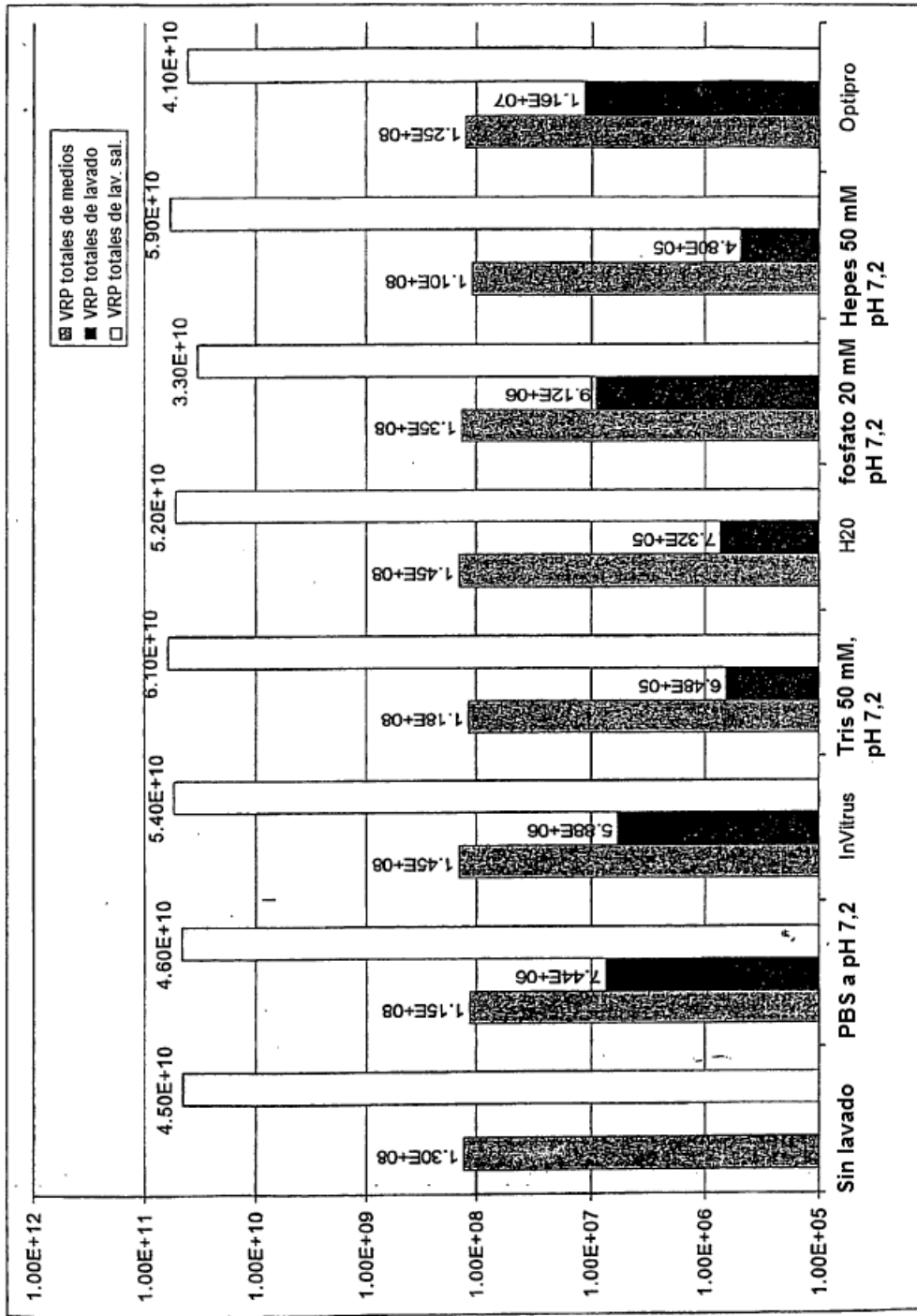


FIG. 4

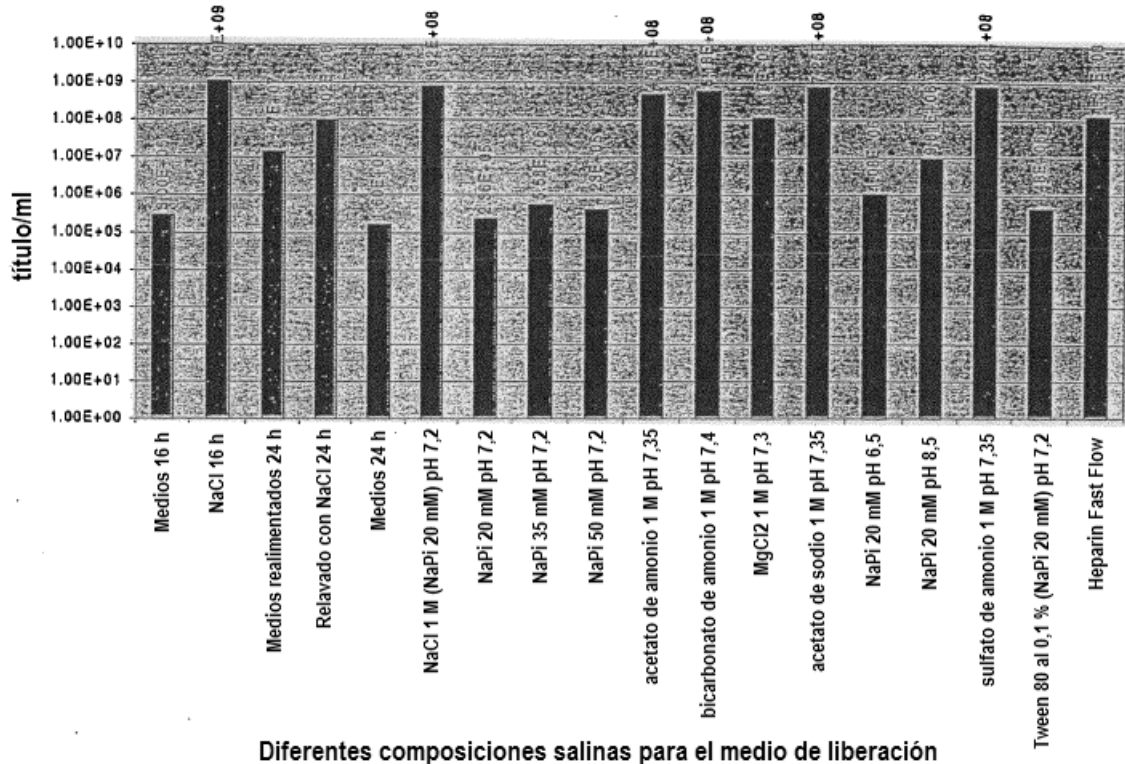


FIG. 5

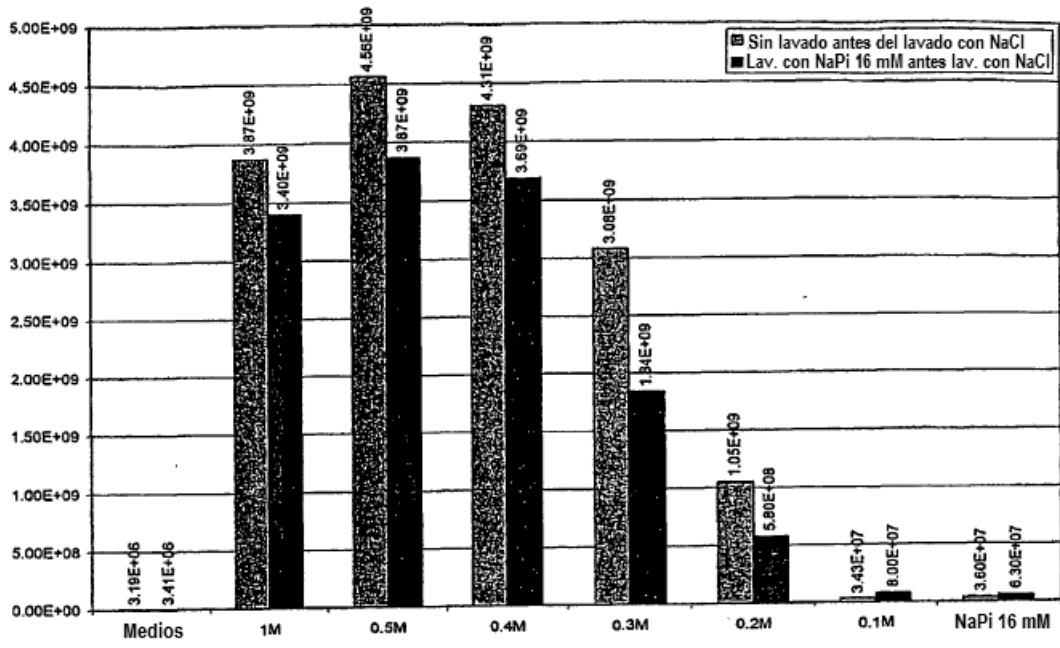


FIG. 6