

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 906**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/40 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2008 PCT/US2008/007701**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2008 WO08156829**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2008 E 08825920 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2183368**

54 Título: **Casetes sin promotor para la expresión de proteínas estructurales de alfavirus**

30 Prioridad:

21.06.2007 US 936637 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2016

73 Titular/es:

**ALPHAVAX, INC. (100.0%)
P.O. BOX 11307 2 TRIANGLE DRIVE
RESEARCH TRIANGLE PARK, NC 27709-0307, US**

72 Inventor/es:

**KAMRUD, KURT I.;
SMITH, JONATHAN F. y
MAUGHAN, MAUREEN**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 588 906 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

Casetes sin promotor para la expresión de proteínas estructurales de alfavirus

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a constructos mejorados y métodos de elaboración de partículas de alfavirus recombinantes.

Antecedentes de la invención

10 Los alfavirus actualmente están siendo utilizados como plataformas de vectores para desarrollar vacunas para enfermedades infecciosas y cáncer (por ejemplo, véase las patentes estadounidenses Nos. 5.792.462; 6.156.558; 5.811.407; 6.531.135; 6.541.010; 6.783.939; 6.844.188; 6.982.087; 7.045.335; 5.789.245; 6.015.694; 5.739.026; Pushko y colaboradores, *Virology* 239 (2): 389-401 (1997), Frolov y colaboradores, *J. Virol.* 71 (1): 248-258 (1997); Smerdou y Liljestrom, *J. Virol.* 73 (2): 1092-1098 (1999)). Los alfavirus comprenden un género en la familia *Togaviridae*, y los miembros del género se encuentran en todo el mundo, tanto en huéspedes vertebrados como invertebrados. Entre los alfavirus más estudiados para plataformas de vectores están el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), el virus del bosque de Semliki (SFV), y el virus Sindbis (SV), el miembro prototipo del género.

15 Una de tales plataformas del vector es el sistema del replicón del alfavirus, que se describe en la patente estadounidense No. 6.190.666 de Garoff y colaboradores, las patentes estadounidenses Nos. 5.792.462 y 6.156.558 de Johnston y colaboradores, las patentes estadounidenses Nos. 5.814.482, 5.843.723, 5.789.245, 6.015.694, 6.105.686 y 6.376.236 de Dubensky y colaboradores; la solicitud estadounidense publicada No. 2002-0015945 A1 (Polo y colaboradores), la solicitud estadounidense publicada No. 2001-0016199 (Johnston y colaboradores), Frolov y colaboradores (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93: 11.371 - 11.377 y Pushko y colaboradores (1997) *Virology* 239: 389-401. Un vector de replicón de alfavirus es modificado genéticamente para contener y expresar uno o más ácidos nucleicos de interés, donde el ácido nucleico de interés puede codificar, por ejemplo, un antígeno, una citoquina, una ribozima, o una enzima. El vector del replicón de alfavirus se pueden derivar de cualquier alfavirus, tal como virus del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), virus Sindbis, por ejemplo, la cepa TR339, el arbovirus sudafricano No. 86, y el virus del bosque de Semliki, entre otros. Se introduce luego el vector en las células en cultivo que permiten la replicación de alfavirus y en las que también se expresan las proteínas estructurales del alfavirus, de modo que el vector es empaquetado por las proteínas estructurales de alfavirus en partículas de replicones de alfavirus (ARP). Las ARP se recolectan luego a partir del cultivo y se suministran en sujetos para una variedad de fines terapéuticos.

20 Se han desarrollado diversos constructos para mejorar la inmunogenicidad y la eficacia del sistema de ARP en las aplicaciones de vacunas. Muchos de estos constructos también han sido diseñados para reducir la probabilidad de formación de alfavirus con capacidad de replicación a través de recombinación de fragmentos del genoma. Johnston y colaboradores (patentes estadounidenses Nos. 5.792.462 y 6.156.558) reconocieron el potencial para la recombinación a partir de un único sistema auxiliar (en el que el conjunto completo de genes de proteínas estructurales de un alfavirus están en una molécula de ARN y los genes de proteínas no estructurales y el ácido nucleico heterólogo de interés están en un ARN del replicón separado), y por lo tanto los sistemas diseñados "doblemente auxiliares" que utilizaron dos ARN auxiliares para codificar las proteínas estructurales. Dubensky y colaboradores (patente estadounidense No. 5.789.245) y Polo y colaboradores (patente estadounidense No. 6.242.259) describen el uso de dos casetes de expresión de ADN de proteína estructural de alfavirus, transformados de manera estable en una línea celular de empaquetamiento, para empaquetar vectores de alfavirus mediante la producción de los ARN que expresan aquellas proteínas estructurales después de la introducción de un vector de replicación de alfavirus en cultivos de la célula de empaquetamiento. Liljestrom y sus colegas han presentado datos que confirma que un "sistema auxiliar sencillo" generará partículas de alfavirus de tipo silvestre (Berglund, y colaboradores, *Biotechnology* 11 (8): 916-920 (1993)). Smith y colaboradores, han descrito otros auxiliares novedosos de ARN que dirigen la expresión de las proteínas estructurales (WO 2004/085660). La solicitud de patente estadounidense No. 2007/065412 describe vectores en los que se remueve un promotor p5 nativo del gen rep y es reemplazado con un promotor mínimo o sin promotor.

25 Mediante la distribución de las secuencias de codificación virales entre tres ácidos nucleicos, dos de los cuales comprenden el sistema auxiliar, tal como se describió anteriormente, se reduce significativamente la frecuencia teórica de recombinación que crearía un virus competente de replicación ("RCV") en relación con sistemas auxiliares individuales. Estos sistemas incluyen el uso del promotor subgenómico alfaviral, a menudo denominado como el promotor 26S o el promotor de la región de unión viral, para proporcionar un constructo que funciona como una unidad transcripcional independiente y el uso de las señales de reconocimiento de ARN polimerasa del alfavirus, de manera que la sistemas auxiliares pueden aprovecharse de la presencia de la maquinaria de replicación del alfavirus para la amplificación y expresión eficiente de las funciones auxiliares. La solicitud de patente estadounidense No. 2006/177819 describe constructos auxiliares de la cubierta del alfavirus con un promotor subgenómico 26S.

30 En los sistemas existentes, se incluyen típicamente señales de empaquetamiento conocidas en los ARN del replicón y

excluidos de constructos auxiliares. Sin embargo, los ARN auxiliares son, sin embargo, empacados o empacados conjuntamente a una frecuencia menor (Lu y Silver, J. Virol Methods, 91 (I): 59-65 (2001)), y los constructos auxiliares con señales de reconocimiento terminales serán amplificadas y expresadas en presencia de un replicón, produciendo potencialmente eventos de recombinación con otras moléculas auxiliares o el ARN del replicón.

5 Los estudios en animales con partículas de replicón del alfavirus han empleado dosis en el intervalo desde 10^5 hasta 10^8 , habiendo sido empleados efectivamente 10^7 , 5×10^7 y 10^8 en primates no humanos, que también son las dosis que se utilizan en ensayos clínicos con humanos. Además, también son útiles dosis superiores, tales como 2×10^8 , 5×10^8 y 10^9 en aplicaciones para seres humanos. Dichas dosificaciones requieren procedimientos de fabricación a gran escala, y a tal escala, es estadísticamente posible que se puedan generar alfavirus con capacidad de replicación con los sistemas existentes auxiliares de ARN.

Por lo tanto, subsiste la necesidad en la técnica de proporcionar sistemas mejorados para la fabricación de partículas de replicón del alfavirus para reducir adicionalmente la frecuencia predicha para la formación de alfavirus con capacidad de replicación, y para optimizar las estrategias y los costes de fabricación.

15 La presente invención proporciona moléculas auxiliares de ARN de alfavirus que codifican las proteínas estructurales de alfavirus que carecen de una secuencia promotora, lo que disminuye significativamente el número teórico de eventos de recombinación funcionales que pudieran ocurrir entre las moléculas auxiliares y el vector del replicón, resultando en una disminución de la predicción teórica para la tasa de formación de alfavirus con capacidad de replicación durante la producción de partículas de alfavirus recombinantes.

Resumen de la invención

20 La presente invención proporciona una molécula de ARN aislada que comprende: a) una secuencia de reconocimiento de replicación 5' de alfavirus, en donde se ha removido un codón de iniciación de la secuencia de reconocimiento de replicación 5'; b) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural de alfavirus; y c) una secuencia de reconocimiento de replicación 3' de alfavirus, con la condición de que la molécula de ARN no contenga un promotor que dirija la transcripción de la secuencia de nucleótidos de (b), y en donde las secuencias de reconocimiento de la replicación 5' y 3' del alfavirus dirigen la replicación de la molécula entera de ARN en presencia de las proteínas no estructurales del alfavirus.

25 Adicionalmente, se proporciona en el presente documento un método de elaboración de una partícula del replicón de alfavirus, que comprende introducir una o más de las moléculas de ARN de esta invención en una célula, por lo que la combinación de moléculas de ARN codifica todas las proteínas estructurales del alfavirus necesarias para la producción de una partícula de replicón de alfavirus, junto con un ARN del replicón de alfavirus, bajo condiciones en las que se producen partículas de replicón del alfavirus.

30 También se proporciona un método de elaboración de una partícula de replicón de alfavirus, que comprende la introducción en una célula de: a) un ARN del replicón de alfavirus; b) una o más de las moléculas de ARN de esta invención; y c) uno o más constructos auxiliares de alfavirus asistidos por el promotor, por lo que la combinación de moléculas de ARN de (b) y constructos auxiliares de (c) codifica todas las proteínas estructurales del alfavirus necesarias para la producción de una partícula de replicón de alfavirus, bajo condiciones en las que se produce una partícula de replicón de alfavirus.

35 En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona una población de partículas de replicones de alfavirus, en donde la población contiene partículas no detectables de virus con capacidad de replicación, como se determina mediante el paso en células permisivas en cultivo.

40 También se proporciona en el presente documento una población de partículas de replicones de alfavirus, en donde la población contiene partículas no detectables de virus con capacidad de replicación, como se determina mediante el paso en células permisivas en cultivo, en donde las partículas de replicón del alfavirus comprenden una o más mutaciones atenuantes, ya sea en una proteína estructural de alfavirus o en una proteína no estructural del alfavirus o tanto una proteína estructural del alfavirus como una proteína no estructural del alfavirus.

Además, la presente invención proporciona un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto, que comprende administrar una cantidad eficaz de la población de partículas de replicones del alfavirus de la presente invención al sujeto.

Breve descripción de los dibujos

50 La Figura 1 muestra la estructura de la secuencia de reconocimiento de replicación 5' (RRS) de una molécula auxiliar sin promotor de longitud completa (FL). La localización de los codones de inicio secuencia arriba de los codones de inicio de la cápside o de la glicoproteína (GP) dentro de la secuencia de reconocimiento de replicación 5' se indican con

5 líneas esbozadas y líneas negras. Las líneas esbozadas indican codones de inicio que están en el marco con la secuencia de codificación de la cápside o GP. Las líneas negras indican codones de inicio que están fuera del marco de lectura con la secuencia de codificación de la cápside o GP. Los números bajo las líneas verticales indican las primeras posiciones de los nucleótidos de los codones de inicio putativos en la secuencia de reconocimiento de replicación 5', numerados desde el terminal 5' de la molécula.

10 La Figura 2 muestra la estructura de las supresiones de la secuencia de reconocimiento de replicación 5' en una molécula auxiliar sin promotor. Las cajas señaladas indican la secuencia de reconocimiento de replicación 5' que queda en cada constructo y el número dentro de la caja es la longitud de nucleótidos de la secuencia. Las líneas negras finas indican la secuencia de reconocimiento de replicación 5' que ha sido suprimida de cada constructo. Las cajas con rayas diagonales representan la ubicación de la secuencia de codificación, ya sea para la cápside o GP.

15 La Figura 3 es un análisis de transferencia tipo Northern. Se extrajo el ARN celular total de células Vero electroporadas con 30 µg de ARN del replicón A pERK/342/MS/BoNT y, o bien 30 µg de dHE1-6M1 (un auxiliar E1 sin promotor) o 30 µg de un ARN auxiliar de GP que contiene un promotor 26S (13.4.6). Se corrió ARN para cada muestra (5 µg) en un gel de glioxal al 1% y se transfirió a una membrana de BrightStar® (Ambion; Austin, TX). Se usó una sonda específica para el extremo 3' del ARN de alfavirus sentido genómico para detectar la replicación de los auxiliares. Carril 1: marcador de peso molecular de ARN, carril 2: auxiliar dHE1-6M1 + replicón A BoNT, carril 3: auxiliar GP asistido por promotor + replicón A BoNT.

20 La Figura 4 es un diagrama que muestra el aminoácido del terminal C y la secuencia de nucleótidos del monómero de ubiquitina y los residuos del terminal N de las secuencias que codifican la cápside y la glicoproteína del alfavirus de constructos estándar (dHcap y dHgp) o ubiquitinados (dHcapU y dHgpU). Los "Met Phe", "Pro Met Phe", "Pro Thr Met Ser" y "Thr Met Ser" en el extremo derecho de estas secuencias representan aminoácidos que se encuentran en el terminal N de las proteínas de la cápside y GP. Los constructos ubiquitinados tienen residuos adicionales del terminal N que no se encuentran en los auxiliares 13.2.2 y 13.4.6. La caja más a la derecha indica el sitio de restricción 3' RsrII y los aminoácidos codificados como resultado de la secuencia primaria de nucleótidos. La caja más a la izquierda representa los residuos críticos para la escisión de ubiquitina de las proteínas estructurales del VEE.

25 La Figura 5 muestra los análisis de transferencia tipo Western (uno usando anticuerpo específico de la cápside y el otro usando anticuerpo específico de glicoproteína (GP)) de lisados de células generados a partir de células electroporadas para producir VRP en un estudio de empaquetamiento (Tabla 10). Se sometieron a electroporación dos auxiliares de ARN, además de un replicón, en las células de la siguiente forma: Carril 1, dHcap6-mut1 y 13.4.6 (GP); Carril 2, Hcap4 y dHgp6-mut1; Carril 3, dHcapU y dHgpU; Carril 4, dHcap (FL) y dHgp (FL); Carril 5, Hcap4 y dHgpU; Carril 6, Hcap4 y dHgp (FL); Carril 7, dHcapU y 13.4.6; Carril 8, dHcap (FL) y 13.4.6; Carril 9, Hcap4 y 13.4.6; Carril 10, marcadores de peso molecular.

35 La Figura 6 muestra un análisis de transferencia tipo Northern de ARN auxiliares de la cápside producidos en células Vero en las que se sometieron a electroporación dos auxiliares de ARN, además de un replicón, en las células de la siguiente manera: Carril 1, dHcap6-mut1 y 13.4.6 (GP); Carril 2, Hcap4 y dHgp6-mut1; Carril 3, dHcapU y dHgpU; Carril 4, dHcap (FL) y dHgp (FL); Carril 5, Hcap4 y dHgpU; Carril 6, Hcap4 y dHgp (FL); Carril 7, dHcapU y 13.4.6; Carril 8, dHcap (FL) y 13.4.6. La molécula de ARN traducible de la cápside en cada carril está marcada con un asterisco.

40 La Figura 7 muestra un análisis de transferencia tipo Northern de los ARN auxiliares de glicoproteína (GP) producidos en células Vero en las que se sometieron a electroporación dos auxiliares de ARN, además de un replicón, en las células de la siguiente manera: Carril 1, dHcap6-mut1 y 13.4.6 (GP); Carril 2, Hcap4 y dHgp6-mut1; Carril 3, dHcapU y dHgpU; Carril 4, dHcap (FL) y dHgp (FL); Carril 5, Hcap4 y dHgpU; Carril 6, Hcap4 y dHgp (FL); Carril 7, dHcapU y 13.4.6; Carril 8, dHcap (FL) y 13.4.6. La molécula de ARN traducible de glicoproteína en cada carril está marcado con un asterisco.

Descripción detallada de la invención

45 Como se usa en este documento, "un", "uno, una" y "el, la" pueden significar uno o más de uno, dependiendo del contexto en el que se utiliza. Por ejemplo, "una" célula puede significar una o múltiples celdas.

También como se usa en este documento, "y/o" se refiere a y abarca cualquiera y todas las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpretan en la alternativa ("o").

50 Por otra parte, el término "aproximadamente", tal como se utiliza en la presente memoria, cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad de un compuesto o agente de esta invención, la dosis, el tiempo, la temperatura, y similares, pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, o incluso $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada.

5 Los términos "secuencia 5' de reconocimiento de replicación del alfavirus", "secuencia 3' de reconocimiento de replicación del alfavirus", "secuencia 5' de reconocimiento de replicación", y "secuencia 3' de reconocimiento de replicación" se refieren a las secuencias de ARN que se encuentran en los alfavirus, secuencias derivadas de los mismos, o secuencias sintéticas basadas en secuencias conservadas entre diversos alfavirus, que son reconocidas por las proteínas replicasa no estructurales de alfavirus y conducen a la replicación de ARN viral. En algunas realizaciones, estas secuencias pueden estar en la forma de ADN para facilitar la preparación, mutación y/o manipulación de los constructos, plásmidos y ácidos nucleicos de esta invención para producir VRP. Estas secuencias también se denominan como "los extremos 5' y 3'", secuencias virales 5' y 3' necesarias para la amplificación mediada por proteínas no estructurales, secuencias 5' y 3' necesarias para la amplificación mediada por proteínas no estructurales, 5' o 3' elemento de la secuencia 5' y 3' conservada (CSE), regiones no codificantes 5' y 3', secuencias de la región 5' y 3' no codificante, viral secuencias 5' y 3' requeridas en cis para replicación, secuencia 5' o 3' que inicia la transcripción de un alfavirus, y/o secuencias 5' y 3' de alfavirus, con las designaciones 5' y 3' que hacen referencia a su localización en el genoma de alfavirus. En las moléculas de ácido nucleico de esta invención, el uso de estos extremos 5' y 3' resultará en la replicación y/o transcripción de la secuencia de ARN codificada entre los dos extremos. Estas secuencias pueden ser modificadas mediante técnicas estándar de biología molecular (por ejemplo, truncadas en cualquier extremo y/o modificadas para eliminar los codones de inicio (es decir, de partida) o para mejorar la traducibilidad) para minimizar aún más el potencial para la recombinación y/o para introducir sitios de clonación, etc., con la condición de que aún deben ser reconocidos por la maquinaria de replicación del alfavirus.

20 Tal como se usa en el presente documento, los términos "codón de iniciación" o "codón de partida" se refieren a un codón que es AUG en el ARN y ATG en el ADN que pueden o no pueden utilizarse en la traducción de una proteína funcional.

25 El término "proteína/proteína(s) estructural(es) de alfavirus" se refiere a uno o una combinación de las proteínas estructurales codificadas por alfavirus. Estas son producidas por el virus de tipo silvestre como una poliproteína y se describen en general en la literatura como C-E3-E2-6k-E1. E3 y 6k sirven como señales de translocación/transporte de membrana para las dos glicoproteínas, E2 y E1. Por lo tanto, el uso del término E1 en la presente memoria puede hacer referencia a E1, E3-E1, 6k-E1, o E3-6k-E1, y uso del término E2 en la presente memoria puede hacer referencia a E2, E3-E2, 6k-E2, PE2, p62 o E3-6k-E2. El término "auxiliar de glicoproteína" o "auxiliar de GP" normalmente se refiere aquí a una molécula auxiliar que codifica tanto glicoproteínas E2 como E1; en ciertas realizaciones de esta invención, E1 y E2 son codificadas en moléculas auxiliares separadas.

30 Los términos "auxiliar(es)" y "moléculas auxiliares" se utilizan indistintamente y se refieren a una molécula de ácido nucleico que expresa ácido nucleico que codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus.

35 Los términos "célula auxiliar" y "célula de empaquetamiento" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a una célula en la que se producen partículas de replicón del alfavirus. La célula auxiliar comprende un conjunto de moléculas auxiliares y/o constructos auxiliares tal como se describe en el presente documento que codifican una o más proteínas estructurales de alfavirus. Los auxiliares pueden ser ARN o ADN o ambos. La célula auxiliar o célula de empaquetamiento puede ser cualquier célula que sea permisiva a alfavirus, es decir, que puede producir partículas de alfavirus tras la introducción de un ARN de replicón. Las células permisivas a alfavirus incluyen, pero no se limitan a, Vero, de riñón de cría de hámster (BHK), 293, 293T/17 (ATCC, número de acceso CRL-11268), fibroblasto de embrión de pollo (CEF), UMNSAH/DF-1 (ATCC, número de acceso CRL-12203) y células de ovario de hámster chino (CHO).

40 Un "promotor" como se usa en el presente documento es una secuencia de ácido nucleico que dirige la transcripción de una molécula de ARN.

45 Una "célula aislada" como se usa en el presente documento es una célula o población de células que ha sido removida del entorno en el que la célula se produce de forma natural y/o es alterada o modificada del estado en el que la célula se produce en su entorno natural. Una célula aislada de esta invención puede ser una célula, por ejemplo, en un cultivo celular. Una célula aislada de esta invención también puede ser una célula que puede estar en un animal y/o ser introducida en un animal y en donde la célula ha sido alterada o modificada, por ejemplo, mediante la introducción en la célula de una partícula de alfavirus de esta invención.

50 Como se usa en este documento, un "promotor subgenómico de alfavirus" o "promotor 26S" es un promotor tal como se define originalmente en un genoma de alfavirus de tipo natural que dirige la transcripción de un ARN mensajero subgenómico como parte del proceso de replicación del alfavirus.

55 El ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, un gen de interés o "GOI" o ácido nucleico de interés o "NOI") que se utiliza en algunas realizaciones de esta invención es un ácido nucleico que no está presente en el genoma de un alfavirus de tipo silvestre y/o no está presente en el genoma de un alfavirus de tipo silvestre en el mismo orden, tal como existe en un ácido nucleico recombinante de esta invención. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el NOI puede codificar una o más proteínas estructurales de alfavirus (por ejemplo, C, PE2/E2, E1, E3, 6K) cuando se utilizan como ácidos nucleicos auxiliares en el ensamblaje de partículas de alfavirus infecciosas, defectuosas (por ejemplo, partículas del replicón de

alfavirus) o como inmunógenos para vacunas contra enfermedades causadas por ciertos alfavirus.

La presente invención se basa en el descubrimiento sorprendente e inesperado de que las moléculas de ARN que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína(s) estructural(es) de alfavirus y secuencias 5' y 3' de alfavirus, en donde se ha eliminado un codón de iniciación de la secuencia de reconocimiento de replicación 5', pero que carecen de una secuencia promotora (por ejemplo, una secuencia promotora de alfavirus subgenómico, a veces denominada como 26S, o región de unión viral, promotora), se pueden replicar de manera que el ARN de hebra positiva de longitud completa se puede traducir de manera eficiente y producir cantidades suficientes de proteínas estructurales de alfavirus en trans para la producción de partículas de replicón del alfavirus en líneas celulares cultivadas. Estas moléculas de ARN "sin promotor", a veces denominadas aquí como "auxiliares de Δ 26S", aumentan el margen de seguridad teórica en una población de partículas de replicón del alfavirus (por ejemplo, producidas para su uso como una vacuna o adyuvante) mediante la disminución de la frecuencia teórica predicha de generación de eventos de recombinación funcionales que se producen entre las moléculas auxiliares y el vector del replicón.

Cualquier sistema auxiliar de escisión requiere un mínimo de dos eventos de recombinación independientes para generar alfavirus con capacidad de replicación (RCV). Para alfavirus, se piensa que la recombinación es predominantemente el resultado de la conmutación al azar de la hebra por el complejo de replicación de ARN (Weiss y colaboradores, 1991), aunque también se ha reportado recombinación homóloga. Para el primer evento de recombinación, el complejo de replicación podría, por ejemplo, empezar en el extremo 3' de una molécula auxiliar de ARN en los sistemas de empaquetamiento del auxiliar/replicón de escisión divulgado en la literatura (por ejemplo, Johnston y colaboradores, patente estadounidense No. 5.792.462). Si el complejo continuó la replicación de este ARN auxiliar a través de la región de 26S o de unión viral y luego cambió a la secuencia de nucleótidos foránea en el ARN del replicón como plantilla y completó la replicación a través del extremo 5' del replicón, el "intermedio del replicón recombinante" contendría una secuencia que codifica todas las proteínas no estructurales, algunas o todas de la unidad de transcripción que contiene el ácido nucleico foráneo de la región de codificación de interés (NOI), y la nueva unidad de transcripción insertada que expresa una de las proteínas estructurales alfavirales. Para crear un RCV, debe ocurrir un segundo evento posterior de recombinación mediante un evento de cambio de hebra en la secuencia de reconocimiento de replicación 3' del intermedio del replicón recombinante (descrito anteriormente), ya que este es el único lugar que resultaría en retención de unidades transcripcionales funcionales para todas las secuencias de codificación de proteínas no estructurales y estructurales sin mutagénesis de inserción. Debido a que las moléculas de ARN auxiliar contienen promotores 26S, dos de tales eventos de recombinación podrían crear, en teoría, un RCV. Los puntos precisos de recombinación no serían críticos porque cada uno de los insertos de recombinación serían una unidad transcripcional independiente.

La generación de RCV utilizando moléculas auxiliares sin promotor de esta invención también requeriría un mínimo de dos eventos de recombinación independientes, pero las limitaciones para la obtención de un recombinante funcional son mucho mayores que para las moléculas auxiliares de ARN conocidas en la literatura y por lo tanto la frecuencia teórica para la generación de RCV es mucho menor. Esto es porque, en ausencia del promotor 26S, la mayoría de los eventos de recombinación no darían lugar a la generación de una unidad transcripcional funcional que podría expresar una proteína estructural de alfavirus. Por lo tanto, la generación de RCV usando moléculas auxiliares sin promotor requerirá la regeneración de un marco de lectura abierto de poliproteína estructural (es decir, sustancialmente similar a la estructura que se encuentra en el virus de tipo silvestre del que se derivan estos auxiliares), y esto a su vez requiere que los dos eventos de recombinación requeridos se produzcan en un orden específico y en lugares muy específicos de nucleótidos. El evento de recombinación inicial debe implicar la secuencia de codificación auxiliar de la cápside, ya que debe estar ubicada en una posición adecuada (es decir, 5') con respecto a las glicoproteínas con el fin de escindirse a sí misma y generar una proteína funcional de la cápside. El auxiliar de la cápside debe ser recombinado con el vector del replicón a través de un evento de recombinación perfecto del nucleótido o cerca del nucleótido para lograr un recombinante en el que habría expresión de la proteína de la cápside a partir del promotor 26S del replicón. Es decir, sólo recombinaciones que 1) sean directamente secuencia abajo del promotor 26S del replicón, 2) sean en el marco con cualquiera de los restos del GOI heterólogo, y 3) no dan lugar a la generación de una proteína de fusión de la cápside de GOI/alfavirus (generando de esta manera una cápside de alfavirus inactiva), serían funcionales. El segundo evento de recombinación, que implica al auxiliar de glicoproteína de alfavirus, tiene las mismas limitaciones que el primero, además de estar limitado para que ocurra en la secuencia de reconocimiento de replicación 3'. Por lo tanto, los métodos de esta invención para la producción de las partículas utilizando las moléculas auxiliares sin promotor teóricamente generarán RCV a una frecuencia mucho más baja que las moléculas auxiliares conocidas en la literatura, una frecuencia tan baja que no se ha detectado tal RCV con los métodos de esta invención.

La naturaleza sorprendente de esta invención reside en el hecho de que los esfuerzos anteriores para producir sistemas auxiliares/replicón para el montaje de partículas de alfavirus se han basado en el uso de un promotor fuerte, más a menudo el promotor subgenómico 26S de alfavirus, para proporcionar suficientes moléculas de ARN a partir de las cuales traducir proteínas estructurales para el montaje. En marcado contraste con la literatura existente, los inventores descubrieron que puedan utilizar moléculas auxiliares novedosas de ARN que pueden ser traducidas directamente como moléculas de longitud completa sin transcripción de los ARN mensajeros más pequeños a partir del promotor 26S y la amplificación del mensajero que normalmente acompaña a este proceso en la propagación de alfavirus de tipo silvestre y sistemas de ARN auxiliar conocidos en la literatura. La traducción directa de los ARN auxiliares de esta

invención se logra entonces, a través del reconocimiento de la cubierta en el extremo 5' del ARN de longitud completa por la maquinaria ribosomal celular. Dentro de una célula eucariota, el inicio de la traducción de un ARNm implica una serie de eventos fuertemente regulados que permiten el reclutamiento de subunidades ribosomales para el ARNm. En el caso de la traducción dependiente de la cubierta, la estructura metil-7-G(5')pppN presente en el extremo 5' del ARNm, conocido como "cubierta", es reconocido por el factor de iniciación celular eIF4F, que se compone de eIF4E, eIF4G y eIF4A (revisado en Hershey y Merrick. Translational Control of Gene Expression, páginas 33-88. Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2000)

Los alfavirus son virus de ARN de hebra positiva; cuando el ARN viral entra en la célula, la traducción de las proteínas no estructurales de alfavirus (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4) se produce a partir de este ARN, y estas proteínas generan una plantilla de ARN de hebra negativa de longitud completa, respectivamente. El ARN de hebra negativa se replica luego para producir un ARN de hebra positiva de longitud completa ("genómico") y una hebra positiva ("subgenómica") más pequeña que se inicia en el promotor 26S. Cuando se producen las hebras positivas, las proteínas no estructurales del alfavirus también cubren el ARN, volviéndolo disponible en el citoplasma para su traducción por los ribosomas. La "cubierta" se refiere a un residuo metilado añadido al extremo 5' del ARN. En realizaciones específicas de esta invención, las moléculas de ARN auxiliar que se producen *in vitro* (que son los ARN de hebra positiva) no están protegidas. Cuando los ARN auxiliares de hebra positiva se introducen en una célula eucariota que contiene también un ARN de replicón, se produce inicialmente en gran medida la síntesis de la hebra negativa. En presencia del ARN del replicón de alfavirus, a partir del cual se sintetizan las proteínas no estructurales, las plantillas de hebra negativa (tanto auxiliares como de replicón) se replicarán en los ARN de hebra positiva que luego son protegidos. En otras formas de realización de esta invención, los ARN auxiliares pueden ser protegidos *in vitro*, utilizando reactivos bien conocidos en la técnica y comercialmente disponibles, por ejemplo, de Promega (Madison, WI) y Ambion (Austin, TX). Las cubiertas pueden incluir una cubierta de G, una cubierta de C, una cubierta de A, G metilada (m⁷G(5'ppp(5')pppG(5)A); G metilada (G(5'ppp(5')A) no metilada; ARCA (análogo de la cubierta antiinversa, 3-O-Me-m⁷G(5')pppG(5)); (m^{2,2,7}G(5'ppp(5')pppG) trimetilada, cubierta de dos vías (m⁷G(5'ppp(5')m⁷G), por ejemplo. En algunas formas de realización, para máximo rendimiento de ARP, todos los auxiliares de esta invención utilizados para producir ARP están o bien protegidos o no protegidos. Los rendimientos más altos se han registrado con ARN auxiliares protegidos, pero, en ciertas realizaciones, los ARN auxiliares no protegidos pueden generar rendimientos suficientemente altos de tal forma que puede ser evitado el coste añadido de la protección. También es posible cubrir sólo uno de los ARN auxiliares, aunque esto también puede a veces limitar los rendimientos de ARP. En general, los inventores han demostrado que el rendimiento de ARP se puede optimizar mediante experimentación de rutina mirando a diversas variables, tales como la variación del uso de la cubierta, la relación del análogo de cubierta con respecto a los NPT en la mezcla de transcripción, y la relación de los ARN utilizados para generar las ARP.

Por lo tanto, en realizaciones particulares, la presente invención proporciona una molécula aislada de ARN que comprende, que consiste esencialmente en, y/o que consiste en: a) una secuencia de reconocimiento de replicación 5' de alfavirus en la que al menos se ha removido un codón de iniciación; b) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural de alfavirus; y c) una secuencia de reconocimiento de replicación 3' de alfavirus, con la condición de que la molécula de ARN no contenga un promotor que dirija la transcripción de la secuencia de nucleótidos de (b), y en donde las secuencias de reconocimiento de replicación 5' y 3' dirijan la replicación de la molécula entera de ARN en presencia de las proteínas no estructurales de alfavirus.

Una amplia variedad de secuencias de ácido nucleico puede cumplir la función de los extremos 5' y 3' en los constructos de ácido nucleico de esta invención. Por ejemplo, la secuencia puede incluir la secuencia de reconocimiento de replicación 5' de alfavirus y otras secuencias adyacentes, como se ejemplificó anteriormente, para el alfavirus VEE. Además, pueden hacerse supresiones en el extremo 5' del alfavirus nativo para remover ciertos elementos estructurales secundarios, por ejemplo estructuras de tallo-bucle. En ciertas realizaciones, se pueden remover una o más de estas estructuras de tallo-bucle de los constructos auxiliares de esta invención. Alternativamente, se pueden emplear secuencias que no son de alfavirus u otras secuencias como este elemento, mientras se mantenga una capacidad funcional similar, por ejemplo, en el caso del virus Sindbis, los nucleótidos 10-75 para asparagina de ARNt (Schlesinger y colaboradores, patente estadounidense No. 5.091.309).

En algunas realizaciones, la secuencia de reconocimiento de replicación 3' de alfavirus puede ser de aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, que contiene esencialmente la secuencia de reconocimiento de replicación 3' nativa de alfavirus. La secuencia de reconocimiento de replicación 3' mínima, conservada entre alfavirus, es una secuencia de 19 nucleótidos (Hill y colaboradores, Journal of Virology, 2693-2704 (1997)). Además, para los virus Sindbis, se ha demostrado que la cola de poli(A) inmediatamente después de la secuencia de reconocimiento de replicación 3' debe ser al menos de 11-12 residuos de longitud y que los 13 nt de 3' de la secuencia de reconocimiento de replicación 3' son fundamentales para la síntesis de ARN de la hebra menos eficiente (Hardy y Rice, Journal of Virology, 79: 4630-4639 (2005)). Por lo tanto, la secuencia para el extremo 3' puede incluir una secuencia completa de reconocimiento de replicación 3' de alfavirus, o una región truncada de la secuencia de reconocimiento de replicación 3', que todavía mantiene la función como una secuencia de reconocimiento, o un extremo 3' que se encuentra entre 25 y 325 nucleótidos de longitud y contiene una poli(a) que corre inmediatamente después de la secuencia de reconocimiento de replicación 3' con una longitud mínima de 11-12 nt. Otros ejemplos de secuencias que se pueden utilizar en este contexto incluyen, pero no están limitados a, secuencias que no son de alfavirus u otras secuencias que mantienen una

capacidad funcional similar para permitir la iniciación de la síntesis de ARN de hebra negativa (por ejemplo, las secuencias descritas en George y colaboradores, J. Virol. 74: 9776-9785 (2000)).

Las secuencias de reconocimiento de replicación 5' y 3' utilizadas en las moléculas de ARN de esta invención se pueden derivar de los mismos o de diferentes alfavirus en cualquier combinación, y pueden utilizarse en cualquier combinación con vectores de replicón que se derivan de los mismos o de diferentes alfavirus.

En ciertas realizaciones de esta invención, las secuencias 5' y 3' de las moléculas auxiliares de ARN se eligen tanto para maximizar el rendimiento de los auxiliares en la generación de las VRP como para minimizar el potencial teórico para la generación de RCV. Las realizaciones específicas pueden incluir modificaciones de las secuencias 5' y 3', así como las supresiones de partes de las secuencias 5' y 3' originales del alfavirus, ejemplos de las cuales se describen en este documento. Existen numerosas combinaciones de secuencias 5' y 3' descritas en esta invención, y se pueden utilizar diferentes combinaciones para cada molécula auxiliar. Dentro de los conocimientos de un experto en la técnica está probar diversas combinaciones de las modificaciones y supresiones enseñadas aquí para determinar su rendimiento en la generación de las VRP.

Las moléculas auxiliares de ARN de esta invención se basan en el escaneo de ribosomas de la estructura de la cubierta 5' a través de la secuencia de reconocimiento de replicación 5' para iniciar la traducción de las proteínas estructurales de alfavirus en su codón de inicio nativo de metionina. La presencia de codones adicionales de iniciación en estas regiones reduce la eficacia de estos auxiliares permitiendo la traducción para iniciar en un sitio diferente al codón de iniciación nativo para las proteínas estructurales, generando de este modo ya sea proteínas de fusión a medida que los ribosomas se mueven a lo largo del ARNm en la región de codificación de la proteína estructural de alfavirus o péptidos cortos no funcionales cuando los ribosomas alcanzan posteriormente un codón de terminación en la secuencia de reconocimiento de replicación 5'. Por lo tanto, el uso de la región no codificante intacta del alfavirus 5' en estos auxiliares (es decir, toda la secuencia desde el terminal 5' del alfavirus de tipo silvestre hasta el primer codón del promotor subgenómico 26S) no es óptimo, debido a la presencia de numerosos codones de inicio y detención en esta región. Por lo tanto, en realizaciones particulares, las moléculas de ARN de esta invención pueden tener uno o más codones de iniciación removidos de la secuencia de reconocimiento de replicación 5'. Por uno o más se entiende que se han removido o inactivado dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, 11, 12 o más codones de iniciación (es decir, codones de inicio) de acuerdo con métodos estándar en la técnica.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una molécula de ARN de esta invención en donde se han removido uno o más codones de iniciación, por ejemplo, por mutación de AUG a GUG, a partir de la secuencia de reconocimiento de replicación 5'. En una realización específica, se proporciona una molécula de ARN en donde todos los codones de iniciación han sido removidos, por ejemplo, por mutación de AUG a GUG, a partir de la secuencia de reconocimiento de replicación 5'. Por ejemplo, se pueden remover uno o más codones de iniciación en cualquier combinación en las siguientes posiciones, como se muestra en la Figura 1, por ejemplo, mutados: 12, 45, 148, 154, 160, 258, 294, 299, 331, 390, 411, 441 y 499.

Mediante la eliminación de un codón de iniciación, se entiende que se modifica la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos en este documento y como se conoce en la técnica) para suprimir o cambiar el codón de iniciación, removiendo o alterando por lo tanto la iniciación o actividad (por ejemplo, la actividad de traducción) en ese sitio. En algunas realizaciones, se pueden remover la mayoría de los codones de iniciación, pero es posible que sólo unos pocos de tales codones en la región 5' de un constructo auxiliar particular, estén en un contexto que normalmente es reconocido por un ribosoma. Por lo tanto, para secuencias 5' específicas, la remoción de 2-3 de tales codones, aparte de 10-12 codones posibles, puede dar lugar a niveles de expresión que no son significativamente diferentes de un constructo en el que se han removido todos los 10-12 codones. Está dentro del alcance de esta invención que existan numerosas secuencias 5' específicas, derivadas de las secuencias de alfavirus de tipo silvestre, que cuando se utiliza en las moléculas auxiliares de esta invención, dará lugar a una expresión suficiente dentro de la célula de empaquetamiento o auxiliar para proporcionar rendimientos aceptables de partículas de replicón del alfavirus.

La molécula de ARN de la presente invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica 1) una proteína de la cápside del alfavirus, 2) las proteínas E1 y E2 del alfavirus en cualquier orden, 3) proteína de la cápside del alfavirus y proteína E1 del alfavirus en cualquier orden, 4) proteína de la cápside del alfavirus y proteína E2 del alfavirus en cualquier orden, 5) proteína E2 del alfavirus, y/o 6) proteína E1 del alfavirus. En otras formas de realización, una única molécula de ARN de esta invención puede codificar las tres proteínas estructurales de alfavirus, es decir, la proteína de la cápside, la proteína E1 del alfavirus y la proteína E2 del alfavirus, en cualquier orden. En algunas realizaciones, la molécula de ARN de esta invención puede excluir específicamente una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural del alfavirus (por ejemplo, la molécula puede excluir específicamente una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la cápside, la proteína E1 del alfavirus, la proteína E2 del alfavirus o cualquier combinación de proteína de la cápside, proteína E1 y proteína E2).

En diversas realizaciones de esta invención, la molécula de ARN puede comprender la secuencia del extremo 5' del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), que incluye una secuencia de reconocimiento de replicación 5'. Según lo descrito por Pushko y colaboradores (1997), la secuencia de reconocimiento de replicación 5' de los auxiliares

asistidos por el promotor de VEE consiste típicamente de 575 nucleótidos (nt) de la secuencia de VEE. Los primeros 519 son contiguos y representan la región no traducida de 44 nt (UTR) y los primeros 475 nt de nsP1 (44 + 475 = 519). Los restantes 56 nt codifican los últimos 21 nt del gen nsP4 (incluyendo el codón de terminación TAA), 7 nt del promotor 26S mínimo (cuya secuencia se superpone parcialmente con el gen nsP4) y una secuencia líder de 28 nt secuencia arriba del codón de iniciación del gen de la proteína estructural del VEE (21 + 7 + 28 = 56).

De este modo, la secuencia completa de reconocimiento de replicación 5' para los auxiliares asistidos por el promotor descritos por Pushko y colaboradores (1997) consta de 575 nt de la secuencia de VEE. Los auxiliares sin promotor de esta invención codifican todos o una parte de los primeros 514 nucleótidos (nt) encontrados en los auxiliares asistidos por el promotor descritos anteriormente. Además de los 514 nt descritos anteriormente, también está presente la secuencia que codifica un sitio de la enzima de restricción RsrII (7 nt) justo secuencia arriba del sitio de inicio de la secuencia de codificación de la proteína estructural (ATG en el ADN; AUG en el ARN). La inclusión de estos nt aumenta la secuencia de reconocimiento 5' para el auxiliar de la cápside de longitud completa (dHcap(FL) hasta 521 nt (sin incluir el residuo A del codón de iniciación).

En algunos ejemplos de los auxiliares sin promotor de la cápside y todos los ejemplos con los auxiliares sin promotor de glicoproteína, se ha añadido una modificación adicional para incluir una secuencia Kozak casi de consenso (3 nt (ACC)) justo secuencia arriba del codón de iniciación de la secuencia que codifica la proteína estructural, pero secuencia abajo de la secuencia RsrII. Debido a la modificación de Kozak, el auxiliar de glicoproteína de longitud completa (dHgp(FL)) tiene una secuencia de reconocimiento de replicación 5' de 524 nt. Con estas secuencias de nucleótidos definidas para la cápside sin promotor y auxiliares de glicoproteína como la secuencia 5' de VEE de "longitud completa" ("FL") para los fines de la siguiente descripción, las supresiones en esta secuencia resultan en otras formas de realización que abarcan la secuencia de reconocimiento de replicación 5'. Estas formas de realización incluyen los nucleótidos 1 a 141 (sin incluir el residuo A del codón de iniciación) de la secuencia de nucleótidos de VEE, como mínimo. Dentro de los primeros 200 nucleótidos de la secuencia 5', se predicen cuatro estructuras de tallo-bucle (SL) en el ARN.

Las realizaciones de la secuencia 5' útiles en los constructos auxiliares de esta invención pueden incluir 1, 2, 3 o todas las estructuras de SL en esta región. Las formas de realización que remueven la región SL2, y conservan las estructuras SL1, SL3 y SL4, son útiles en los constructos auxiliares de esta invención. Las estructuras 1 y 2 de SL están contenidas en los primeros 145 nucleótidos; SL 3 y 4 están presentes entre los nucleótidos 145 y 200. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la secuencia de reconocimiento de replicación 5' está incluida en una región 5' no codificante del constructo que es de 524 nucleótidos de longitud (por ejemplo, dHgp(FL) en la Figura 2) y en otras formas de realización, la secuencia de reconocimiento de replicación 5' puede ser incluida en una región 5' no codificante que está en cualquier lugar desde 70 (por ejemplo, que contiene SL1, SL3 y SL4) hasta 524 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la secuencia de reconocimiento de replicación 5' puede ser de 141, 144 (dH # 8) 200, 203 (dH # 7), 248, 249 (dH # 6), 309, 312 (dH # 5), 351, 354 (dH # 4) #, 412, 415 (dH # 3) 450, 452 (dH # 2), 499 o 502 (dH # 1) nucleótidos de longitud, incluyendo cualquier número entre 70 y 524 no específicamente mencionado en el presente documento (por ejemplo, 237, 379, 444, etc.). Cabe señalar que el número exacto de nucleótidos y la longitud varí a ligeramente entre diferentes alfavirus y entre diferentes cepas de un alfavirus dado. Está también dentro de la capacidad de un experto en la técnica, identificar los lugares correspondientes de los nucleótidos descritos en el presente documento con base en la correspondiente estructura y/o función y/o de las estructuras secundarias que se describen en este documento en cualquier alfavirus y crear las moléculas auxiliares de ARN de esta invención, así como las modificaciones descritas anteriormente de la secuencia primaria de nucleótidos de cualquier alfavirus.

Las moléculas auxiliares de ARN de esta invención también comprenden la secuencia desde el extremo 3' de un alfavirus, que en realizaciones particulares, puede ser, pero no se limita a virus de la encefalitis equina venezolana, que incluye la secuencia de reconocimiento de replicación 3' de alfavirus. Los 19 nucleótidos del terminal 3' de todos los alfavirus están muy conservados, mientras que la secuencia 3' entre el último codón de la glicoproteína E1 y los 19 nucleótidos altamente conservados, está menos conservada, tanto en términos de longitud como de secuencia entre alfavirus. La longitud de la región 3' no codificadora (incluyendo los 19 nucleótidos conservados, en el presente documento la SEQ ID NO: 52) puede estar en el intervalo de 25 a 325 nucleótidos. En realizaciones específicas de esta invención, la secuencia 3' está entre 73 a 117 nucleótidos del extremo 3' de VEE. En realizaciones particulares, la secuencia de reconocimiento de replicación 3' de alfavirus de esta invención puede comprender, consistir esencialmente de y/o consistir de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 55 (para dHcap(FL) hasta dHcap7; dHcap(FL)mm hasta dHcap7mm, dHcap(FL)mut1 hasta dHcap7-mut1), SEQ ID NO: 56 (para Hgp(FL) hasta dHgp7, dHgp(FL)mm hasta dHgp7-mm, dHgp(FL)mut1 hasta dHgp7-mut1), SEQ ID NO: 57 (para dHcap6mut1 (w/detención), SEQ ID NO: 58 (para dHcap7mut1 (w/detención)+19nt y dHgp7mut1-S+19nt), y SEQ ID NO: 59 (dHcap6mut1 (W-detención).

En realizaciones particulares, la secuencia de reconocimiento de replicación 5' de alfavirus de esta invención puede comprender, consistir esencialmente de y/o consistir de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 (dHcap(FL)), SEQ ID NO: 2 (dHcap1), SEQ ID NO: 3 (dHcap2), SEQ ID NO: 4 (dHcap3), SEQ ID NO: 5 (dHcap4), SEQ ID NO: 6 (dHcap5), SEQ ID NO: 7 (dHcap6), SEQ ID NO: 8 (dHcap7), SEQ ID NO: 9 (dHcap8), SEQ ID NO: 10 (dHgp(FL)), SEQ ID NO: 11 (dHgp1), SEQ ID NO: 12 (dHgp2), SEQ ID NO: 13 (dHgp3), SEQ ID NO: 14 (dHgp4), SEQ ID NO: 15 (dHgp5), SEQ ID NO: 16 (dHgp6), SEQ ID NO: 17 (dHgp7), SEQ ID NO: 18 (dHgp8), SEQ ID NO: 19 (dHcap(FL)-mm),

SEQ ID NO: 20 (dHcap1-mm), SEQ ID NO: 21 (dHcap2-mm), SEQ ID NO: 22 (dHcap3-mm), SEQ ID NO: 23 (dHcap4-mm), SEQ ID NO: 24 (dHcap5-mm), SEQ ID NO: 25 (dHcap6-mm), SEQ ID NO: 26 (dHcap7-mm), SEQ ID NO: 27 (dHgp(FL)-mm), SEQ ID NO: 28 (dHgp1-mm), SEQ ID NO: 29 (dHgp2-mm), SEQ ID NO: 30 (dHgp3-mm), SEQ ID NO: 31 (dHgp4-mm), SEQ ID NO: 32 (dHgp5-mm), SEQ ID NO: 33 (dHgp6-mm), SEQ ID NO: 34 (dHgp7-mm), SEQ ID NO: 35 (dHcap(FL)mut1), SEQ ID NO: 36 (dHcap1 mut1), SEQ ID NO: 37 (dHcap2 mut1), SEQ ID NO: 38 (dHcap3 mut1), SEQ ID NO: 39 (dHcap4 mut1), SEQ ID NO: 40 (dHcap5 mut1), SEQ ID NO: 41 (dHcap6 mut1), SEQ ID NO: 42 (dHcap7 mut1), SEQ ID NO: 43 (dHgp(FL) mut1), SEQ ID NO: 44 (dHgp1 mut1), SEQ ID NO: 45 (dHgp2 mut1), SEQ ID NO: 46 (dHgp3 mut1), SEQ ID NO: 47 (dHgp4 mut1), SEQ ID NO: 48 (dHgp5 mut1), SEQ ID NO: 49 (dHgp6 mut1), SEQ ID NO: 50 (dHgp7 mut1), SEQ ID NO: 51 (dHcap6-mutl-dSL2), SEQ ID NO: 52 (dHgp6-mutl-dSL2(-S)); SEQ ID NO: 53 (dHcapU); y la SEQ ID NO: 54 (dHgpU). El auxiliar específico para el que se han sintetizado estos ejemplos de la secuencia 5' se indica entre paréntesis. Las secuencias pueden variar ligeramente en longitud debido a la utilización de nucleótidos adicionales para proporcionar una secuencia de consenso de Kozak casi óptima para mejorar la traducción de la secuencia de codificación de la proteína estructural en algunos de los constructos auxiliares. (El ATG (AUG en el ARN) de la región codificante para la secuencia de codificación de la proteína estructural no está incluido en estas secuencias 5'). Las moléculas de ARN de esta invención que comprenden las secuencias de nucleótidos identificadas anteriormente se pueden emplear en los métodos de esta invención para la producción de partículas de replicón del alfavirus en cualquier combinación, en cualquier orden y/o en cualquier multiplicidad.

La presente invención proporciona adicionalmente un vector y/o un constructo de ácido nucleico que comprende la molécula de ARN de esta invención. Se proporciona además una célula que comprende una o más moléculas de ARN de esta invención y uno o más vectores del replicón de alfavirus. Por uno o más se entiende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, etc. Una célula de esta invención es cualquier célula en la que se pueden expresar los constructos de ácido nucleico que codifican proteínas de alfavirus. Los ejemplos de células de esta invención incluyen, pero no se limitan a, Vero, de riñón de cría de hámster (BHK), 293, 293T/17 (número de acceso ATCC, CRL-11268), fibroblastos de embrión de pollo (CEF), UMNSAH/DF-1 (número de acceso ATCC, CRL-12203), PERC.6 y células de ovario de hámster chino (CHO).

Se proporciona además en el presente documento un método de elaboración de una partícula de replicón de alfavirus, que comprende introducir una o más de las moléculas de ARN de esta invención en una célula, por lo que la combinación de moléculas de ARN codifica todas las proteínas estructurales del alfavirus necesarias para la producción de una partícula de replicón de alfavirus, junto con un ARN de replicón de alfavirus, bajo condiciones en las que se producen partículas de replicón del alfavirus. En algunas realizaciones de esta invención, la partícula de alfavirus imita la elaboración estructural del alfavirus nativo, en donde el ARN del replicón se recubre con la proteína de la cápside y luego se envuelve con la membrana celular que contiene las glicoproteínas de alfavirus. En tales realizaciones, las proteínas estructurales de alfavirus son todas del mismo alfavirus. En realizaciones alternativas, las proteínas de alfavirus pueden ser de diferentes alfavirus, siempre que estas diferentes proteínas de "reconozcan" entre sí durante el montaje de las partículas o que se modifiquen (como se describe en la literatura) para que puedan ser capaces de reconocer entre sí.

En algunas realizaciones de los métodos de esta invención, se introducen dos moléculas de ARN de esta invención en una célula de esta invención, en donde las dos moléculas de ARN codifican diferentes proteínas estructurales de alfavirus en una combinación por lo que se producen todas las proteínas estructurales necesarias en la célula de empaquetamiento para producir partículas de replicones de alfavirus. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método en el que se introducen dos moléculas de ARN en la célula y en donde una primera molécula de ARN de las dos moléculas de ARN codifica una o más proteínas estructurales del alfavirus pero no todas las proteínas estructurales y una segunda molécula de ARN de las dos moléculas de ARN codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus que no son codificadas por la primera molécula de ARN.

También se proporciona un método en donde se introducen tres moléculas de ARN de esta invención en una célula, en donde las tres moléculas de ARN codifican cada una proteína estructural diferente de alfavirus, en una combinación mediante la cual se producen todas las proteínas estructurales necesarias en la célula para producir partículas de replicones de alfavirus. Por lo tanto, se proporciona un método, en el que se introducen tres de las moléculas de ARN de esta invención en la célula, en donde una primera molécula de ARN de las tres moléculas de ARN codifica una o más proteínas estructurales del alfavirus pero no todas las proteínas estructurales y una segunda molécula de ARN de los tres moléculas de ARN codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus que son diferentes de las proteínas estructurales del alfavirus codificadas por la primera molécula de ARN y una tercera molécula de ARN de las tres moléculas de ARN codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus que son diferentes de las proteínas estructurales de alfavirus codificadas por la primera molécula de ARN y la segunda molécula de ARN. Por ejemplo, en una realización, la primera molécula de ARN puede codificar una proteína de la cápside del alfavirus, la segunda molécula de ARN puede codificar la glicoproteína E1 de alfavirus y la tercera molécula de ARN pueden codificar glicoproteína E2 de alfavirus.

En algunas realizaciones, uno o más, pero no todas, las proteínas estructurales de alfavirus pueden ser codificadas por el ARN del replicón que es empacado por las proteínas estructurales del alfavirus. Por ejemplo, un ARN recombinante utilizado en los métodos de elaboración de partículas de replicón del alfavirus reivindicado en este documento puede

comprender, como un ácido nucleico de interés y/o además de un ácido nucleico de interés, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína estructural de alfavirus o más de una proteína estructural de alfavirus. Por lo tanto, en una realización específica, un ARN de replicón codifica una proteína estructural de alfavirus o más de una proteína estructural de alfavirus. Este ARN de replicón puede ser introducido en una población de células junto con una o más moléculas auxiliares de ARN de esta invención, de manera que el ARN del replicón y la(s) molécula(s) auxiliar(es) de ARN produce(n) todas las proteínas estructurales de alfavirus, y el ARN del replicón es empaquetado en partículas en dichas células.

En realizaciones adicionales, se proporciona un método para la elaboración de una partícula de replicón de alfavirus, que comprende introducir en una célula: a) un ARN de replicón de alfavirus; b) una o más moléculas de ARN de esta invención; y c) uno o más constructos auxiliares de alfavirus asistido por un promotor, por lo que la combinación de moléculas de ARN de (b) y constructos auxiliares de (c) codifica todas las proteínas estructurales del alfavirus necesarias para la producción de una partícula de replicón de alfavirus, bajo condiciones en las que se produce una partícula de replicón de alfavirus.

Por lo tanto, en formas de realización adicionales de esta invención, se usan "constructos auxiliares asistidos por promotor", es decir, moléculas de ADN o ARN recombinantes que expresan una o más proteínas estructurales de alfavirus bajo la dirección de un promotor, por ejemplo, el promotor 26S, en combinación con las moléculas auxiliares de esta invención. En un conjunto de formas de realización de la molécula de ARN, el "constructo auxiliar asistido por promotor" comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica (i) una secuencia de reconocimiento de replicación 5' de alfavirus, (ii) un promotor transcripcional, (iii) una secuencia de ácido nucleico que codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus, y (iv) una secuencia de reconocimiento de replicación 3' de alfavirus.

En otro conjunto de realizaciones de moléculas de ARN, el "constructo auxiliar asistido por promotor" es un ácido nucleico auxiliar recombinante, como se describe en el documento WO 2004/085660 (publicado el 7 de octubre de 2004, que comprende: una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de reconocimiento de replicación 5' de alfavirus, un promotor subgenómico de alfavirus inmediatamente secuencia arriba de un elemento IRES, al menos un ácido nucleico que codifica una proteína estructural del alfavirus, y un ácido nucleico que codifica una secuencia de reconocimiento de replicación 3' de alfavirus. En otras realizaciones, estos constructos auxiliares asistidos por promotor pueden comprender un ácido nucleico espaciador situado inmediatamente secuencia abajo del promotor subgenómico e inmediatamente secuencia arriba del elemento IRES. El ácido nucleico espaciador puede comprender o consistir de cualquier secuencia de ácido nucleico no codificante aleatoria o específica que es de una longitud suficiente para evitar al menos algunas, y en algunas realizaciones, toda la traducción de la cubierta 5' de un ARN mensajero, de tal forma que la traducción de las proteínas estructurales es dirigida entonces por el IRES, en parte o en su totalidad. Alternativamente, el ácido nucleico espaciador puede ser de una estructura de longitud y secuencia que imparte suficiente estructura secundaria al ácido nucleico para evitar por lo menos alguna y posiblemente toda la actividad de traducción de la cubierta 5' de un ARN mensajero. Los constructos auxiliares asistidos por promotor utilizados en esta invención también pueden ser moléculas de ADN, que pueden ser integradas de manera estable en el genoma de la célula auxiliar o transitoriamente expresadas a partir de un episoma (por ejemplo, un plásmido) sin integración significativa. La molécula de ADN de esta invención puede ser cualquier vector de ADN, incluyendo, pero no limitado a, un vector de ADN no integrador, tal como un plásmido, o un vector viral.

En formas de realización de esta invención que emplean "células auxiliares" o "células de empaquetamiento" como se describe en el presente documento, y que comprenden una molécula de ARN sin promotor de esta invención, la célula auxiliar puede comprender, además, un constructo auxiliar asistido por promotor (ARN y/o ADN) en cualquier combinación tal que la célula auxiliar comprende una combinación de secuencias de nucleótidos que codifican proteínas estructurales de alfavirus suficientes para producir una partícula de replicón de alfavirus de esta invención. En ciertas formas de realización, las glicoproteínas E1 y E2 están codificadas por un primer constructo auxiliar, y la proteína de la cápside está codificada por un segundo constructo auxiliar. En otra realización, las glicoproteínas E1, la glicoproteína E2, y la proteína de la cápside son cada una codificadas por constructos auxiliares separados (por ejemplo, primero, segundo y tercero). En aún otras realizaciones, la proteína de la cápside y, o bien la glicoproteína E1 o la E2 son codificadas por un primer constructo auxiliar, y la glicoproteína E1 o E2 restante no incluida en el primer constructo auxiliar está codificada por un segundo constructo auxiliar, con o sin la secuencia de codificación de la cápside. En realizaciones adicionales, las glicoproteínas E1 y E2 de alfavirus, así como la proteína de la cápside pueden ser codificadas en un constructo auxiliar, en cualquier orden y/o en cualquier multiplicidad. Entre las realizaciones incluidas en esta invención, también es posible que una proteína estructural dada del alfavirus sea expresada por más de un constructo auxiliar. Los auxiliares de ARN sin promotor de esta invención, opcionalmente en combinación con otros auxiliares conocidos como se describe en el presente documento, se pueden introducir en una célula permisiva a alfavirus en cualquier combinación, en cualquier orden y/o en cualquier multiplicidad.

En algunas realizaciones de esta invención (por ejemplo, para los constructos de ADN que codifican moléculas de ARN sin promotor o constructos auxiliares de ARN asistidos por promotor), se utiliza un promotor para dirigir la transcripción de ARN a partir de ADN, es decir, una ARN polimerasa dependiente de ADN para sintetizar ARN en una reacción de transcripción *in vitro*, y los promotores específicos adecuados para este uso incluyen, pero no se limitan a, los promotores de ARN polimerasa SP6, T7, y T3.

En todas las realizaciones de esta invención, se contempla que al menos una de las proteínas estructurales de alfavirus y/o no estructurales codificadas por las moléculas auxiliares sin promotor y/o constructos auxiliares asistidos por promotor y/o el vector del replicón, así como las regiones no traducidas del ácido nucleico del replicón, pueden contener una o más mutaciones atenuantes, tal como se describe en este documento, en cualquier combinación.

5 La presente invención proporciona además una población de partículas de replicones de alfavirus, en donde la población contiene menos de una partícula de alfavirus con capacidad de replicación por 10^8 partículas de replicón del alfavirus. En realizaciones adicionales, la población contiene menos de una partícula de alfavirus con capacidad de replicación por 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} o 10^{13} partículas de replicón del alfavirus. La presente invención proporciona, además, una población de partículas de replicones de alfavirus, en donde la población contiene partículas de virus detectables con capacidad de replicación, como se determina mediante el paso en células permisivas en cultivo de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

10 También se proporciona en este documento una población de partículas de replicón del alfavirus, en donde la población contiene partículas de alfavirus no detectables con capacidad de replicación, o menos de una por cada 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} o 10^{13} partículas de replicón del alfavirus, tal como se determina mediante el paso en células permisivas en cultivo, en donde las partículas de replicón del alfavirus comprenden una o más mutaciones atenuantes, ya sea en una proteína estructural del alfavirus o una proteína no estructural del alfavirus o tanto una proteína estructural de alfavirus como una proteína no estructural del alfavirus. Se proporciona adicionalmente una población de partículas de replicones de alfavirus, en donde la población contiene partículas de virus no detectables con capacidad de replicación, como se determina mediante el paso en células permisivas en cultivo, en donde las partículas de replicón del alfavirus comprenden una o más mutaciones atenuantes, ya sea en una proteína estructural del alfavirus o una proteína no estructural del alfavirus o tanto una proteína estructural del alfavirus como una proteína no estructural del alfavirus.

15 Se ha confirmado por los inventores que, a pesar de la falta de una "señal de empaquetamiento" identificable, los ARN auxiliares de esta invención, así como los ARN auxiliares descritos en la literatura, están empaquetados por las proteínas estructurales del alfavirus en las células cultivadas, a veces a una frecuencia que es considerablemente mayor que la reportada en la literatura. Por lo tanto, la población de partículas de replicones de alfavirus de esta invención se distingue de aquellas partículas descritas en la literatura por la presencia de un subconjunto de partículas en la población en la que se empaquetan las nuevas moléculas auxiliares de esta invención.

20 Los términos "partículas de replicón del alfavirus", "las ARP", "partículas de replicón del virus" o "partículas de alfavirus recombinantes", que se utilizan aquí de forma intercambiable, significan un complejo estructural tipo virión que incorpora un ARN del replicón de alfavirus que expresa una o más secuencias de ARN heterólogo. Típicamente, el complejo estructural tipo virión incluye una o más proteínas estructurales de alfavirus embebidas en una envoltura lipídica que encierra una nucleocápside que a su vez encierra el ARN. La envoltura lipídica se deriva típicamente de la membrana plasmática de la célula en la que se producen las partículas. En ciertas realizaciones, el ARN del replicón de alfavirus está rodeado por una estructura nucleocápside compuesta de la proteína de la cápside del alfavirus, y las glicoproteínas de alfavirus están embebidas en la envoltura lipídica derivada de células. Las proteínas estructurales y el ARN del replicón se pueden derivar de los mismos o diferentes alfavirus. En una realización específica, el ARN del replicón se deriva de VEE y las proteínas estructurales se derivan de virus Sindbis (véase, por ejemplo, Dubensky y colaboradores, patente estadounidense No. 6.376.236). Las partículas de replicones de alfavirus son infecciosas pero de propagación defectuosa, es decir, el ARN del replicón no puede propagarse más allá de la célula huésped que las partículas inicialmente infectan, en ausencia del(de los) ácido(s) nucleico(s) auxiliar(es) que codifica(n) las proteínas estructurales de alfavirus.

25 Los términos "replicón del ARN de alfavirus", "ARN del replicón de alfavirus", "replicón del vector de ARN de alfavirus", y "ARN del replicón del vector" se utilizan indistintamente para referirse a una molécula de ARN que expresa genes de proteínas no estructurales de manera que puede dirigir su propia replicación (amplificación) y comprende, como mínimo, secuencias de reconocimiento de replicación 5' y 3' de alfavirus (que pueden ser las secuencias mínimas, como se definió anteriormente, pero pueden ser, alternativamente, las regiones enteras del alfavirus), secuencias que codifican proteínas no estructurales de alfavirus, y un tramo de poliadenilación. Puede contener además un promotor y/o un IRES. También puede ser modificado genéticamente para expresar proteínas estructurales de alfavirus. Johnston y colaboradores y Polo y colaboradores, describen numerosos constructos para tales replicones de ARN de alfavirus, y tales constructos, en una realización del ARN del replicón de alfavirus, las proteínas no estructurales de alfavirus se separan en dos unidades traduccionales diferentes, como se describe en la publicación de la patente estadounidense No. 2003-0119182-A1.

30 Un ARN del replicón de alfavirus con secuencias no heterólogas, es decir, un replicón vacío, se puede utilizar en una partícula de replicón de alfavirus para producir una composición de adyuvante. Alternativamente, el ARN del replicón de alfavirus puede expresar ácido nucleico que codifica proteínas estructurales de alfavirus y/o otras secuencias heterólogas de ácido nucleico, las últimas de los cuales pueden ser elegidas de una amplia variedad de secuencias derivadas de virus, procarionotas y/o eucariotas. Ejemplos de categorías de secuencias heterólogas incluyen, pero no se limitan a, inmunógenos (incluyendo proteínas, péptidos, fragmentos inmunógenos, o epítomos antigénicos, nativos, modificados o sintéticos), citoquinas, toxinas, proteínas terapéuticas, enzimas, secuencias antisentido, y moduladores

de la respuesta inmune. Si es apropiado y deseado para la aplicación particular, se traduce luego el ARNm transcrito, es decir, se sintetiza la proteína o se produce un ARN funcional. Estos ARNm se "protegen" dentro de la célula eucariota, es decir, está presente una estructura de metil-7-guanosina(5')pppN y está presente en el extremo 5' del ARNm (el "cubierta" o "cubierta 5'"), y esta cubierta es reconocida por los factores de iniciación de la traducción que sintetizan la proteína a partir del ARNm. Por lo tanto, el promotor 26S dirige la transcripción, y la "cubierta" proporciona la señal de iniciación de la traducción.

En algunas realizaciones, el ARN del replicón puede carecer de ácido nucleico que codifica cualquier proteína estructural del alfavirus. En otras formas de realización, el ARN del replicón de alfavirus puede comprender ácido nucleico que codifica una o dos proteínas estructurales de alfavirus, pero el ARN del replicón no contiene ácido nucleico que codifica todas las proteínas estructurales de alfavirus. Por lo tanto, las partículas resultantes del replicón de alfavirus de esta invención son de propagación defectuosa puesto que el replicón de ARN no codifica todas las proteínas estructurales necesarias para la encapsidación del ARN del replicón y el montaje de un virión infeccioso.

Las realizaciones específicas de los replicones de ARN de alfavirus utilizados en la invención reivindicada pueden contener una o más mutaciones atenuantes como se describe en detalle en este documento, los ejemplos de una sustitución atenuante de nucleótidos incluyen la mutación en el nucleótido 3 en el extremo 5' de VEE descrito en este documento y una mutación en la posición 538 del aminoácido nsP1, la posición 96 del aminoácido nsP2, o la posición 372 del aminoácido nsP2 en el alfavirus S.A.AR86.

Las partículas de replicones de alfavirus de esta invención pueden comprender ARN del replicón de cualquier alfavirus. Además, las partículas de replicones de alfavirus de esta invención pueden comprender proteínas estructurales de alfavirus de cualquiera de los alfavirus de esta invención. Por lo tanto, las partículas de replicón pueden ser elaboradas por ARN del replicón y las proteínas estructurales del mismo alfavirus o de diferentes alfavirus, las últimas de las cuales serían partículas de replicones de alfavirus quiméricos (por ejemplo, una partícula que comprende ARN del replicón basado en virus de VEE y proteínas estructurales del virus de Sindbis).

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

En algunas realizaciones de esta invención, la presente invención puede incluir ácidos nucleicos de alfavirus, proteínas de alfavirus, ARN del replicón de alfavirus y/o partículas de replicones de alfavirus que incluyen una o más mutaciones atenuantes, una mutación atenuante que se define como una supresión, adición, y/o sustitución de nucleótidos de uno o más nucleótidos, o una mutación que comprende reordenamiento o un constructo quimérico, lo que resulta en una pérdida de virulencia en un virus vivo que contiene la mutación en comparación con el alfavirus de tipo silvestre apropiado.

Las mutaciones atenuantes apropiadas dependerán del alfavirus utilizado, y serán conocidas por los expertos en la técnica. Los ejemplos de mutaciones atenuantes incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la patente estadounidense No. 5.505.947 de Johnston y colaboradores, la patente estadounidense No. 5.185.440 de Johnston y colaboradores, la patente estadounidense No. 5.643.576 de Davis y colaboradores, las patentes estadounidenses Nos. 5.792.462, 6.156.558 y 5.639.650 de Johnston y colaboradores, cuyas descripciones se incorporan aquí en su totalidad por referencia.

Las mutaciones atenuantes específicas para la glicoproteína E1 de VEE pueden incluir una mutación atenuante en cualquiera de las posiciones 81, 272 o 253 de aminoácidos de E1. Las partículas de replicones de alfavirus elaboradas a partir del mutante VEE-3042 contienen una sustitución de isoleucina en E1-81, y partículas de replicones del virus elaboradas a partir del mutante VEE-3040 contienen una mutación atenuante en E1-253. Las mutaciones atenuantes específicas para la glicoproteína E2 de VEE pueden incluir una mutación atenuante en cualquiera de las posiciones 76, 120, o 209 de aminoácidos de E2. Las partículas de replicones de alfavirus elaboradas a partir del mutante VEE-3014 contienen mutaciones atenuantes tanto en E1-272 como en E2-209 (véase la patente estadounidense No. 5.792.492). Una mutación atenuante específica para la glicoproteína E3 de VEE incluye una mutación atenuante que consiste en una supresión de los aminoácidos 56-59 de E3. Las partículas de replicón del virus elaboradas a partir del mutante VEE-3526 contienen esta supresión en E3 (aa56-59), así como una segunda mutación atenuante en E1-253. Las mutaciones atenuantes específicas para la glicoproteína E2 de SAAR86 incluyen una mutación atenuante en cualquiera de las posiciones 304, 314, 372, o 376 de aminoácidos de E2. Alternativamente, la mutación atenuante puede ser una sustitución, supresión o inserción de un aminoácido en la glicoproteína E2, por ejemplo, en una cualquiera o más de las siguientes posiciones de aminoácidos en cualquier combinación: 158, 159, 160, 161 y 162 (véase Polo y colaboradores, publicación PCT No. WO 00/61772.). Alternativamente, las moléculas de ARN de esta invención se pueden derivar de

TC83, una cepa de vacuna de VEE (véase el documento WO 2005/113782).

Otra mutación atenuante de esta invención puede ser una mutación atenuante en el nucleótido 3 del ARN genómico de VEE, es decir, el tercer nucleótido después de la cubierta metilada en 5' (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.643.576 que describe una mutación G → C en nt 3). Esta mutación, que se encuentra en una secuencia no codificante del virus o replicón, puede ser una mutación G → A o G → U en algunas realizaciones. Cuando las proteínas estructurales y/o no estructurales del alfavirus son de SAAR86, los ejemplos de mutaciones atenuantes en las proteínas estructurales y no estructurales han sido descritas en la literatura (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.639.650 y la patente estadounidense No. 6.982.087).

El alfavirus de esta invención puede ser una cepa del virus Sindbis (por ejemplo, TR339), VEE (por ejemplo, que tiene una mutación en el nucleótido 3 del ARN genómico después de la cubierta metilada o TC83), del virus SAAR86, del virus Girdwood S.A., del virus Ockelbo, y/o virus quiméricos de los mismos. Las secuencias genómicas completas, así como las secuencias de las diversas proteínas estructurales y no estructurales están disponibles en la literatura para numerosos alfavirus e incluyen: la secuencia genómica del virus Sindbis (GenBank, acceso No. J02363; NCBI, acceso No. NC_001547), secuencia genómica S.A.AR86 (GenBank, acceso No. U38305), secuencia genómica de VEE (GenBank, acceso No. L04653; NCBI, acceso No. NC_001449), cepa de la vacuna TC-83 de VEE (Kinney RM y colaboradores, (1989) Virology 170: 19-30; con la corrección observada en Kinney RM y colaboradores, (1993) J. Virol 67 (3): 1269-1277); secuencia genómica de Girdwood SA (GenBank, acceso No. U38304), secuencia genómica del virus del bosque Semliki (GenBank, acceso No. X04129; NCBI, acceso No. C_003215), y la secuencia genómica de TR339 (Klimstra y colaboradores, (1988) J. Virol. 72: 7357; McKnight y colaboradores, (1996) J. Virol 70: 1981).

Las partículas de replicones de alfavirus se preparan de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria en combinación con técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos incluyen primero la introducción del(de los) auxiliar(es) seleccionado(s) y un ARN del replicón de alfavirus en una población de células permisiva a alfavirus, y a continuación incubar las células bajo condiciones bien conocidas en la técnica que permite la producción de partículas de replicones del alfavirus. La etapa de introducir el(los) auxiliar(es) y ARN del replicón de alfavirus en la población de células auxiliares puede realizarse mediante cualquier medio adecuado, como se describe en este documento y como lo saben aquellos generalmente capacitados en la técnica.

Las poblaciones de partículas de replicones de alfavirus se recogen de las células auxiliares o de empaquetamiento de acuerdo con métodos, por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense No. 7.078.218. Alternativamente, pueden ser recogidas a partir de células de empaquetamiento utilizando otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5.492.462 y 6.156.558). Estas poblaciones se evalúan para detectar la presencia de virus capaces de replicación (RCV) de acuerdo con métodos como se describe en este documento y como se conoce en la literatura. Las poblaciones de esta invención contienen RCV no detectable, tal como se determina mediante el paso en células permisiva a alfavirus en cultivo.

En algunas realizaciones, la presente invención puede emplearse para empaquetar un replicón de ARN de alfavirus que codifica un polipéptido inmunogénico en un sujeto (por ejemplo, para vacunación), para inmunoterapia (por ejemplo, para el tratamiento de un sujeto con cáncer o tumores), o un factor inmunomodulador (por ejemplo, para adyuvan las ARP u otras modalidades de la vacuna). La presente invención proporciona métodos para inducir o reforzar una respuesta inmune en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un ácido nucleico empaquetado en partículas mediante los constructos auxiliares de esta invención.

Como se usa en este documento, "provocar una respuesta inmune" e "inmunización de un sujeto" incluyen el desarrollo, en un sujeto, de una respuesta inmune humoral y/o celular a una proteína y/o polipéptido de esta invención (por ejemplo, un inmunógeno, un antígeno, un péptido inmunogénico, y/o uno o más epítopos). Una respuesta inmune "humoral", como es bien conocido este término en la técnica, se refiere a una respuesta inmune que comprende anticuerpos, mientras una respuesta inmune "celular", como es bien conocido este término en la técnica, se refiere a una respuesta inmune que comprende linfocitos T y otros glóbulos blancos, especialmente la respuesta específica de inmunógeno por células T citolíticas restringidas a HLA, es decir, las "CTL".

También se contempla que los ácidos nucleicos, partículas, poblaciones y composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden emplear en los métodos de suministro de un NOI de interés a una célula, que puede ser una célula en un sujeto. Por lo tanto, la presente invención proporciona un método para suministrar un ácido nucleico heterólogo a una célula, que comprende introducir en la célula una cantidad eficaz de una partícula, población y/o composición empacada con los constructos auxiliares de esta invención. También se proporciona un método de suministro de un ácido nucleico heterólogo a una célula en un sujeto, que comprende suministrar al sujeto una cantidad eficaz de una partícula, población y/o composición empacada con los constructos auxiliares de esta invención. La célula puede ser cualquier célula que pueda captar y expresar ácidos nucleicos exógenos. La célula se mantiene bajo condiciones en las que el ácido nucleico heterólogo se expresa para producir una proteína, péptido u otro producto de la secuencia de codificación (por ejemplo, una secuencia funcional de ARN) codificado por el ácido nucleico heterólogo. Tales métodos pueden ser empleados para impartir un efecto terapéutico en una célula y/o un sujeto de esta invención, de acuerdo con protocolos bien conocidos para inmunización y/o terapia génica.

Un "sujeto" de la presente invención incluye, pero no se limita a, animales de sangre caliente, por ejemplo, primates humanos, primates no humanos, caballos, vacas, gatos, perros, cerdos, ratas y ratones.

La presente invención proporciona además una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende una partícula y/o población de partículas de esta invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es ni biológicamente ni de otra forma indeseable, es decir, el material puede administrarse a un sujeto junto con las partículas seleccionadas, y/o poblaciones de las mismas, sin causar efectos biológicos nocivos sustanciales o interactuar de una forma perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición en los que está contenido. El vehículo farmacéuticamente aceptable es adecuado para administración o suministro a los seres humanos y otros sujetos de esta invención. El vehículo, naturalmente, sería seleccionado para minimizar cualquier degradación del ingrediente activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, como sería conocido por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science; última edición). Las formulaciones farmacéuticas, tales como vacunas u otras composiciones inmunogénicas, de la presente invención comprenden una cantidad inmunogénica de las partículas infecciosas de replicones de alfavirus, de propagación defectuosa, producidas usando los constructos auxiliares de esta invención, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua estéril libre de pirógenos y solución salina fisiológica estéril libre de pirógenos.

Una "cantidad inmunogénica" es una cantidad de las partículas infecciosas de alfavirus en la población de esta invención que es suficiente para provocar una respuesta inmune en un sujeto al que se le administra o suministra la población de partículas. Una cantidad de aproximadamente 10^4 hasta aproximadamente 10^9 , especialmente 10^6 hasta 10^8 , unidades infecciosas, o "IU", como se determina por ensayos descritos en la presente memoria, por dosis, se considera adecuada, dependiendo de la edad y la especie del sujeto a tratar. La administración puede ser por cualquier medio adecuado, tal como por vía intraperitoneal, intramuscular, intranasal, intravaginal, por vía intravenosa, intradérmica (por ejemplo, mediante una pistola de genes), por vía rectal y/o por vía subcutánea. Las composiciones de esta invención se pueden administrar a través de un método de escarificación de la piel, y/o por vía transdérmica mediante un parche o líquido. Las composiciones se pueden administrar por vía subdérmica en forma de un material biodegradable que libera las composiciones durante un período de tiempo.

Como se usa en la presente memoria, "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una población o una composición o formulación de esta invención que es suficiente para producir un efecto deseado, que puede ser un efecto terapéutico. La cantidad eficaz variará con la edad, la condición general del sujeto, la gravedad de la afección a tratar, el agente particular administrado, la duración del tratamiento, la naturaleza de cualquier tratamiento concurrente, el vehículo farmacéuticamente aceptable utilizado, y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia de los expertos en la técnica. Según el caso, una "cantidad eficaz" en cualquier caso individual puede ser determinada por un experto ordinario en la técnica por referencia a los textos y la bibliografía pertinentes y/o mediante el uso de experimentación de rutina. (Véase, por ejemplo, Remington, The Science And Practice of Pharmacy (20 ed. 2000)).

Alternativamente, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser adecuadas para administración a las membranas mucosas de un sujeto (por ejemplo, mediante administración intranasal, administración bucal y/o por inhalación). Las formulaciones se pueden preparar convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica.

Además, la composición de esta invención se puede usar para infectar o ser transfectada en células dendríticas, que se aíslan o se cultivan a partir de células de un sujeto, de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, o sobre células mononucleares de sangre periférica a granel (PBMC) o diversas subfracciones celulares de las mismas de un sujeto.

Si se emplean métodos *ex vivo*, se pueden remover células o tejidos y mantenerse fuera del cuerpo de acuerdo con protocolos estándar bien conocidos en la técnica, mientras que las composiciones de esta invención se introducen en las células o tejidos.

Las composiciones inmunogénicas que comprenden una población de las partículas (que dirigen la expresión de la(s) secuencia(s) de ácido nucleico de interés cuando se administran las composiciones a un humano o animal) de la presente invención, pueden formularse por cualquier medio conocido en la técnica. Tales composiciones, especialmente vacunas, se preparan típicamente como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. Las preparaciones liofilizadas son también adecuadas.

Los ingredientes inmunogénicos activos (por ejemplo, las partículas de replicón del alfavirus) se mezclan a menudo con excipientes y/o vehículos que son farmacéuticamente aceptables y/o compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua estéril, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos, así como estabilizadores, por ejemplo, HSA u otras proteínas adecuadas y azúcares reductores.

- Además, si se desea, las vacunas pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes y/o emulsionantes, agentes reguladores del pH, y/o adyuvantes que mejoran la eficacia de la vacuna. Ejemplos de adyuvantes que pueden ser eficaces incluyen, pero no se limitan a: QS-21, adyuvante de Freund (completo e incompleto), sales de aluminio (alumbre), fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio; N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP); N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado como nor-MDP); N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina (CGP19835A, denominado como MTP-PE); y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, lípido A monofosforilado, dimicolato de trehalosa y esqueleto de la pared celular (MPL + TDM + CWS) en una emulsión de 2% de escualeno / Tween 80.
- Los ejemplos adicionales de adyuvantes pueden incluir, pero no se limitan a, formulaciones en emulsión de aceite en agua, agentes inmunoestimulantes, tales como componentes de la pared celular bacteriana o moléculas sintéticas, u oligonucleótidos (por ejemplo, CpG) y polímeros de ácido nucleico (tanto ARN como ADN bicatenarios como monocatenarios), que puede incorporar fracciones alternativas de cadena principal, por ejemplo, polímeros de polivinilo.
- La eficacia de un adyuvante puede determinarse midiendo la cantidad de anticuerpos o células T citotóxicas dirigidas contra el producto inmunogénico de las partículas de replicón del alfavirus derivado de la administración de la composición que contiene partículas en una formulación de vacuna que comprende también un adyuvante o combinación de adyuvantes. También se pueden utilizar tales formulaciones y modos de administración adicionales, como se conocen en la técnica.
- Los adyuvantes se pueden combinar, ya sea con las composiciones de esta invención o con otras formulaciones de vacuna que se pueden utilizar en combinación con las composiciones de esta invención.
- Las composiciones de la presente invención también pueden incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, vehículos, y diluyentes.
- Las composiciones de esta invención se pueden optimizar y combinar con otros regímenes de vacunación para proporcionar las más amplias respuestas humorales y celulares posibles (es decir, que cubren todos los aspectos de la respuesta inmune, incluyendo aquellas características descritas aquí anteriormente). En ciertas realizaciones, esto puede incluir el uso de estrategias de refuerzo primario heterólogo, en las que se utilizan las composiciones de esta invención en combinación con una composición que comprende uno o más de los siguientes: inmunógenos derivados de un patógeno o tumor, inmunógenos recombinantes, ácidos nucleicos desnudos, ácidos nucleicos formulados con fracciones que contienen lípidos, vectores no alfavirus (que incluyen pero no se limitan a vectores de la viruela, vectores adenovirales, vectores virales adenoasociados, vectores del virus del herpes, vectores del virus de la estomatitis vesicular, vectores paramixovirus, vectores de parvovirus, vectores de papovavirus, vectores retrovirales, vectores de lentivirus), y otros vectores de alfavirus. Los vectores virales pueden ser partículas similares a virus o ácidos nucleicos. Ejemplos de vectores de alfavirus pueden ser partículas que contienen replicones, vectores que contienen replicones con base en ADN (a veces conocidos como un sistema "ELVIS", véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.814.482) y/o vectores de ARN desnudo.
- Las poblaciones y composiciones inmunogénicas (o biológicamente activas) que contienen la partícula de alfavirus de esta invención se administran de una manera compatible con la formulación de la dosificación y en una cantidad tal que sea profiláctica y/o terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrar, que está generalmente en el intervalo de aproximadamente 10^4 hasta aproximadamente 10^9 unidades infecciosas por mL en una dosis, depende del sujeto a tratar, la ruta por la que se administran o suministran las partículas, la inmunogenicidad del producto de expresión, los tipos de respuestas efectoras inmunes deseadas, y el grado de protección deseado. En algunas realizaciones, dosis de alrededor de 10^6 , 10^7 , y 10^8 IU pueden ser particularmente eficaces en sujetos humanos. Las cantidades eficaces de ingrediente activo requeridas para ser administradas o suministradas pueden depender del juicio del médico, veterinario u otro profesional de la salud y pueden ser específicas para un sujeto dado, pero tal determinación está dentro de las capacidades de dicho profesional.
- Las composiciones y formulaciones de esta invención se pueden administrar en una sola dosis o esquema de dosis múltiple. Un programa de dosis múltiple es uno en el que un curso primario de administración puede incluir 1 a 10 o más dosis separadas, seguido de otras dosis administradas a intervalos de tiempo posteriores según sea necesario para mantener y o reforzar el efecto deseado (por ejemplo, una respuesta inmune), por ejemplo, semanal o en 1 a 4 meses para una segunda dosis, y si es necesario, una dosis posterior después de varios meses (por ejemplo, 4 o 6 meses) / año.
- La eficacia de los métodos de tratamiento de esta invención puede determinarse de acuerdo con protocolos bien conocidos para la determinación del resultado de un tratamiento de un trastorno de esta invención. Los determinantes de la eficacia del tratamiento, incluyen, pero no se limitan a, la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad, la mejora de los síntomas, el tiempo de progresión y/o la calidad de vida, etc., como son bien conocidos en la técnica.

"Tratar" o "tratamiento" se refiere a cualquier tipo de acción que imparte un efecto de modulación, que, por ejemplo, puede ser un efecto beneficioso, para un sujeto aquejado de un trastorno, enfermedad o dolencia, incluyendo la mejora en la condición del sujeto (por ejemplo, en uno o más síntomas), retraso o reducción del avance de la enfermedad, la prevención o retraso de la aparición del trastorno, la enfermedad o la dolencia, y/o el cambio en cualquiera de los parámetros clínicos de un trastorno, enfermedad o dolencia, etc., como sería bien conocido en la técnica.

Se entiende que la descripción detallada anterior se ofrece únicamente a modo de ilustración y que pueden hacerse modificaciones y variaciones en la misma sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de los auxiliares dHcap y dHgp

Se diseñaron cebadores (cápside F (SEQ ID NO: 98), GP F (SEQ ID NO: 60) y 13-101.pr4 (SEQ ID NO: 61) (Tabla 1), para amplificar los genes de la cápside y la glicoproteína (GP) genes fuera de los plásmidos auxiliares de VEE (denominados como "13.2.2" para el auxiliar de la cápside y "13.4.6" para el auxiliar de glicoproteína), que se describen en la patente estadounidense No. 5.792.462, Pushko y colaboradores, 1997 (Virology 239: 389-401), y la publicación PCT WO 02/03917 (Olmsted y colaboradores). Estos cebadores proporcionan un sitio de restricción Rsr II y también se unen al inicio de la secuencia de codificación de la cápside o glicoproteína, respectivamente. Los plásmidos de ADN descritos en las referencias citadas anteriormente son una fuente conveniente para la obtención de los fragmentos que codifican la proteína estructural, por ejemplo, mediante amplificación por PCR. Alternativamente, estos fragmentos de codificación se pueden obtener a partir de clones de longitud completa de VEE o variantes atenuadas del mismo (véase la patente estadounidense No. 5.185.440; la patente estadounidense No. 5.505.947).

La amplificación con estos cebadores dio como resultado fragmentos con los siguientes elementos, que se enumeran a partir de los extremos 5' a 3' del producto de la PCR: 5'- sitio de restricción de RsrII, ORF de la secuencia de codificación de la proteína estructural de VEE, 3' UTR, sitio de restricción de SphI - 3'. Los productos de la PCR fueron digeridos luego con enzimas de restricción RsrII y SphI y se ligaron en un vector del replicón de VEE vacío, como se describe en la patente estadounidense No. 5.792.462, Pushko y colaboradores, 1997 (Virology 239: 389-401) y la publicación PCT No. WO 02/03917 (Olmsted y colaboradores). Este ARN del replicón contiene los genes no estructurales del VEE y una sola copia del promotor de ARN subgenómico 26S seguido de un sitio de clonación múltiple (MCS). En un constructo de vacuna, se insertan una o más secuencias de codificación que codifican un inmunógeno en este sitio de clonación. Este vector se digiere con RsrII y SphI (removiendo la mayor parte de nsP1 y todos los nsPs2-4), y tras la ligación, se generan auxiliares que comprenden los extremos completos 5' y 3' del alfavirus, es decir, los extremos "de longitud completa". Por tanto, estos dos auxiliares se designan como dHcap(FL) y dHgp(FL) y tienen las secuencias 5' de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 10, respectivamente y las secuencias 3' de SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56, respectivamente (Figura 1).

Posteriormente, se hicieron ocho supresiones consecutivas de aproximadamente 50 nt cada una en el extremo 5' de 522 nt presente tanto en los auxiliares dHgp(FL) como dHcap(FL) (Figura 2). El procedimiento se llevó a cabo en dos etapas. En primer lugar, se diseñaron ocho cebadores inversos diferentes (dHelp3-8 R, SEQ ID NOS: 63-70) complementarios al extremo 5' hasta la posición 502 de los auxiliares 13.2.2 y 13.4.6 (descritos aquí anteriormente), y cada uno fue modificado por ingeniería genética para contener adicionalmente un sitio de restricción RsrII (Tabla 1). Se diseñó un cebador directo (3-16.1.1 (SEQ ID NO: 62), Tabla 1), que cuando se combina con cualquiera de los cebadores inversos, amplifica un fragmento con los siguientes elementos (enumerados 5' hasta 3'): 5'-sitio de restricción XbaI, promotor T7, extremo truncado 5', sitio de restricción RsrII-3'. En segundo lugar, se clonaron los fragmentos del extremo truncado 5' amplificado en los auxiliares dHcap(FL) y dHgp(FL) linealizados con XbaI y RsrII. Esto generó ocho conjuntos de constructos auxiliares del extremo truncado 5', designados como dHcap1-8 y dHgp1-8, que tienen las secuencias 5' de SEQ ID NOS: 2-9 y SEQ ID NOS: 11-18, respectivamente. La secuencia 3' de cada miembro de la serie dHcap se proporciona en este documento como SEQ ID NO: 55 y la secuencia 3' de cada miembro de la serie dHgp se proporciona en este documento como SEQ ID NO: 56.

Ejemplo 2. Métodos para el análisis de expresión de casetes de expresión auxiliares sin promotor

Para determinar qué tan bien las configuraciones auxiliares Δ 26S descritas aquí expresaron proteínas estructurales del VEE, se sometió a electroporación cada auxiliar en células Vero junto con un vector del replicón de VEE como se describió anteriormente. A los efectos de demostrar la capacidad de los nuevos casetes de expresión de proteína estructural sin promotor de esta invención, se construyeron los replicones del VEE mediante la inserción de una GFP o una secuencia de codificación de neurotoxina botulínica en el sitio de clonación del vector del replicón de VEE. La expresión de estas secuencias de codificación de partículas elaboradas con diversas combinaciones de los casetes de expresión de la proteína estructural sin promotor descritos en este documento demuestra la utilidad y la novedad de estos casetes.

Se transcribió ARN a partir de cada una auxiliar y del vector del replicón mediante transcripción final usando kits de

transcripción RiboMAX T7 Express® (Promega Corporation, Madison, WI) de acuerdo con el procedimiento del fabricante. Antes de la electroporación, se purificaron el auxiliar y los ARN del replicón por cromatografía a base de sílice. Se combinaron treinta microgramos (30 µg) de cada ARN auxiliar y de replicón y se sometieron a electroporación en 3-5 x 10⁷ células Vero. Se diluyeron en el medio las células sometidas a electroporación y se sembraron en matraces de 25 cm² o placas de 96 pozos. Las células electroporadas se incubaron luego durante 16-24 horas a 37°C.

A. Análisis de IFA

Las células electroporadas sembradas en placas de 96 pozos se lavaron con solución salina regulada con fosfato (PBS) una vez y después se fijaron con acetona : metanol (1:1) a temperatura ambiente durante cinco min. Se analizaron luego las células por la expresión de la cápside o la proteína GP de VEE usando anticuerpos de ratón específicos de la proteína estructural. Se diluyó el anticuerpo primario en PBS : FBS (1:1) y se añadieron 100 µl a cada pozo. Se incubaron las placas a 37°C durante 30 min, se lavaron con 150 µl de PBS tres veces y después se incubaron con anticuerpo secundario antirratón de cabra Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 30 min a 37°C. Después de la incubación, se lavaron las células de nuevo como se describió anteriormente y se añadió un volumen final de 100 µl de PBS a cada pozo antes de la inspección por microscopía de fluorescencia ultravioleta (Nikon Eclipse TE300).

B. Análisis tipo Northern

Las células electroporadas sembradas en matraces de 25 cm² se lavaron con PBS y luego se extrajo el ARN celular total utilizando el reactivo de aislamiento de ARN RNAwiz® (Ambion, Austin, TX) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Se determinó la concentración de ARN por espectrofotometría. Se sometieron a electroforesis cinco microgramos (5 µg) de cada muestra a través de un gel de agarosa al 1% de glioxal y se transfirió pasivamente el ARN a membranas BrightStar Plus® (Ambion). El análisis tipo Northern se llevó a cabo con un oligo de ADN biotinilado específico para la hebra positiva de la secuencia de reconocimiento de replicación 3' del VEE usando un kit BioDetect® de BrightStar (Ambion) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Se detectó la quimioluminiscencia mediante la exposición de las membranas procesados a una película.

C. Análisis de la expresión de dHcap(FL) y dHgp(FL)

Para demostrar que los auxiliares Δ26S de longitud completa (dHcap(FL) y dHgp(FL)) podrían replicarse y expresar proteínas, estos ARN auxiliares se sometieron a electroporación en células junto con un vector del replicón, que es necesario para proporcionar las proteínas no estructurales de alfavirus que facilitan la replicación de los ARN auxiliares. Se sometieron a electroporación células Vero ya sea con 30 o 60 µg de ARN auxiliar dHcap(FL) o dHgp(FL) combinado con 30 µg de ARN del replicón. Las células electroporadas fueron procesadas para IFA, transferencia tipo Western y análisis tipo Northern como se describió anteriormente.

Ejemplo 3: Análisis de la expresión de auxiliares Δ26S truncados y de longitud completa

Los auxiliares dHcap(FL) y dHgp(FL) expresaron proteína según lo determinado por IFA y transferencia tipo Western y se replicaron eficazmente como se demuestra mediante transferencia tipo Northern.

El conjunto completo de auxiliares Δ26S truncados (supresiones 1-8) tanto para la cápside como para GP se analizaron para la expresión de proteínas por IFA y por transferencia tipo Northern para determinar qué tan bien se expresó y replicó cada uno. Se combinó cada ARN auxiliar dHcap con un ARN del replicón de VEE y el ARN auxiliar de glicoproteína 13.4.6, y se sometieron a electroporación los tres ARN en células Vero. El análisis tipo Northern e IFA se llevaron a cabo como se describió anteriormente. Los resultados de IFA utilizando un anticuerpo específico de la cápside se muestran en la Tabla 2. Todos los auxiliares dHcap fueron positivos para la expresión de la cápside por IFA aunque el auxiliar dHcap8 era sólo débilmente positivo.

El análisis tipo Northern del ARN extraído de células electroporadas indicó que todos los auxiliares Δ26S de la cápside truncadas se replicaron bien a excepción de dHcap8.

Los auxiliares dHgp se examinaron de manera similar pero el auxiliar de la cápside 13.2.2 no se incluyó en este experimento. Cada auxiliar dHgp se combinó con un ARN del replicón de VEE, se sometió a electroporación en las células, y se generaron las muestras como se describió anteriormente para IFA y análisis tipo Northern. Los resultados de IFA anti-GP se muestran en la Tabla 3. De manera similar a los auxiliares dHcap, todos los auxiliares dHgp fueron positivos, excepto dHgp8. Todos los auxiliares dHgp se replicaron bien con la excepción de dHgp8.

Ejemplo 4: Constructos auxiliares modificados sin promotor

Los inventores observaron que los auxiliares dHcap(FL) y dHgp(FL) expresaron proteínas de fusión, según lo revelado por la transferencia tipo Western. Tales proteínas de fusión podrían ser el resultado de la iniciación de la traducción en codones de inicio en el marco secuencia arriba del codón de inicio para la cápside o GP en las transcripciones del

auxiliar $\Delta 26S$. Uno de tales codones secuencia arriba es el codón nativo de iniciación para nsP1 de VEE (localizado en el nucleótido 45 en el genoma viral de VEE), que está presente en el extremo 5' tanto de los auxiliares dHcap como dHgp, y está en un contexto favorable para la iniciación de la traducción (por ejemplo, una secuencia de consenso Kozak). Es posible que un codón de inicio en un entorno de Kozak favorable podría ser utilizado para el escaneado de ribosomas a partir del extremo 5' protegido de estos auxiliares, generando de este modo proteínas de fusión que no son funcionales y la disminución de la producción de la cápside funcional y polipéptidos de glicoproteína del codón de inicio apropiado localizado secuencia abajo.

Se utilizaron dos enfoques para disminuir la cantidad de tales proteínas de fusión producidas y aumentar la expresión de la proteína glicoproteína de la cápside de longitud completa. En primer lugar, el codón de inicio favorable descrito anteriormente fue mutado a un codón de terminación TAG y los codones de inicio restantes se dejaron sin cambio. Se usó este enfoque para mantener la secuencia del extremo 5' tan cerca como sea posible de la secuencia presente en el genoma nativo de VEE, a fin de mantener los elementos de replicación confiables para estos auxiliares. En segundo lugar, todos los codones de inicio secuencia abajo de nt 3 (incluido el codón de inicio nsP1 (favorable)) y se cambiaron el marco de lectura abierto (ORF) de la secuencia que codifica la cápside o la glicoproteína de AUG a GUG (hubo un total de 12 de tales cambios). Se adoptó este enfoque para determinar si los codones menos favorables ATG (AUG en el ARN) también pueden tener efectos perjudiciales sobre la producción de la expresión de la glicoproteína o de la cápside de longitud completa.

A. Construcción de los auxiliares dHcap-mut1 dHgp-mut1

Para generar auxiliares dHcap y dHgp que tienen el codón de inicio favorable de nsP1 cambiado a un codón de terminación TAG, se llevó a cabo mutagénesis dirigida al sitio en cada auxiliar dHcap y dHgp, generando un conjunto completo (FL y truncamientos 1-7) de auxiliares mutados, designados como auxiliares dHcap-mut1 y dHgp-mut1, que tienen secuencias 5' como las proporcionadas en el presente documento como las SEQ ID NOS: 35-42 y 43-50, respectivamente. La mutagénesis dirigida a sitio se llevó a cabo con un kit de mutagénesis dirigido al sitio Quikchange XL® (Stratagene, La Jolla, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante utilizando cebadores directos (SEQ ID NO: 71) e inversos (SEQ ID NO: 72) en Tabla 4.

B. Construcción de auxiliares dHcap-mm y dHgp-mm

Para generar auxiliares dHcap y dHgp con extremos 5' que no tengan ningún codón de inicio secuencia abajo de nt 3 y codones de inicio de ORF de la cápside o de GP, se llevó a cabo una mutagénesis dirigida al sitio para cambiar todos los codones ATG intervinientes (AUG en el ARN) por GTG (GUG en ARN). Se utilizó un constructo dHgp(FL) como plantilla para la mutagénesis dirigida al sitio. Su usó un kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios Quikchange® (Stratagene) para introducir los cambios de codón utilizando el protocolo del fabricante. Los cebadores utilizados para introducir los cambios de codones se muestran en la Tabla 5 (SEQ ID NOS: 73-82). El constructo dHgp(FL) que contenía todos los cambios de codón fue denominado como dHgp-mm(FL) (que tiene la secuencia 5' proporcionada en el presente documento como SEQ ID NO: 19). Después de confirmación en la secuencia que todos los cambios de codones estaban presentes, se usó este ADN para generar el constructo dHcap(FL)-mm mediante el reemplazo de la secuencia de reconocimiento de replicación 5' dHcap(FL) con la secuencia de reconocimiento de replicación 5' de dHgp(FL)-mm. Esto se logró mediante la digestión de ambos ADN con enzimas RsrII y NotI. Se ligó luego el fragmento de la secuencia de reconocimiento de replicación 5' dHgp(FL)-mm RsrII/NotI con el ADN linealizado dHcap(FL), generando dHcap-mm(FL) (que tiene la secuencia 5' proporcionada en el presente documento como la SEQ ID NO: 27). Además, se utilizó el ADN de dHgp(FL)-mm como molde para generar conjuntos de extremo truncado 5' para ambos auxiliares de la cápside y GP utilizando el método y cebadores descritos anteriormente para dHcap 1-7 y dHgp 1-7. Los nuevos auxiliares fueron denominados dHcap1mm - dHcap7mm (que tiene secuencias 5' proporcionadas en el presente documento como las SEQ ID NOS: 20-26) y dHgp1mm - dHgp7mm (que tiene secuencias 5' proporcionadas en el presente documento como las SEQ ID NOS: 28-34).

C. Análisis de la expresión de auxiliares sin promotor mut1 y mm

Se analizó la producción de proteína a partir de diversas versiones de mut1 y mm de los auxiliares $\Delta 26S$ descritos anteriormente. En este experimento, se analizaron por transferencias tipo Western los dHcap6-mut1 (con la secuencia 5' proporcionada en el presente documento como la SEQ ID NO: 41), dHcap6-mm (con la secuencia 5' proporcionada en el presente documento como la SEQ ID NO: 25), dHcap7-mm (con la secuencia 5' proporcionada en el presente documento como la SEQ ID NO: 26) y dHgp7-mm (con la secuencia 5' proporcionada en el presente documento como SEQ ID NO: 27), así como los auxiliares 13.2.2 y 13.4.6. Los auxiliares $\Delta 26S$ que contienen las mutaciones mm expresaron principalmente proteínas GP o de la cápside de longitud completa con pocas o sin proteínas de fusión detectables. Los auxiliares mut1 expresaron cantidades significativas de proteína estructural de longitud completa, pero también continuaron expresando algunas proteínas de fusión.

El análisis tipo Northern se llevó a cabo en las mismas muestras para analizar las características de replicación de los auxiliares $\Delta 26S$ mut1 y mm. Los resultados indican que el auxiliar dHcap6-mut1 replica también al auxiliar de la cápside

13.2.2. Por el contrario, los auxiliares dHcap6-mm, dHcap7-mm y dHgp7-mm parecen replicarse en menor medida que los auxiliares 13.2.2 o mut1.

Ejemplo 5: Generación de partículas del replicón de VEE con auxiliares $\Delta 26S$

5 Se muestran en la Tabla 6 una serie de experimentos que combinan diferentes auxiliares de la cápside y de GP sin promotor con un ARN del replicón de VEE para producir partículas del replicón de VEE (VRP). Además, la cantidad de cada ARN auxiliar introducido en las células también se varió en algunos experimentos. Las VRP fueron generados por electroporación de 5×10^7 de 1×10^8 células Vero con las cantidades indicadas de ARN auxiliar, así como 30 μg de ARN del replicón. En general, para todos los experimentos en los cuales se generan partículas, se sembraron células electroporadas en matraces de 300 cm^2 que contenían medio libre de suero y se incubaron 16-24 horas antes de recolectar las VRP.

10 Los títulos de VRP se determinaron mediante la infección de células Vero, cultivadas en placas de 96 pozos, con diluciones seriales de diez veces de la muestra, la incubando las células durante 16 - 18 h, fijando las células y realizando IFA con anticuerpos específicos para la proteína nsP2 de VEE o el producto del ácido nucleico de interés. Los rendimientos de VRP se reportan ya sea como rendimiento total de un experimento (es decir, Tabla 6) o sobre una base por ml de una preparación de 20 ml (Tablas 7, 9 a 13, 15 y 16).

15 Estas preparaciones también analizadas para la presencia de un virus con capacidad de replicación (RCV) mediante un ensayo de efecto citopático (CPE). El ensayo CPE consistió de dos pasajes ciegos en un cultivo celular para detectar la presencia de RCV. Para la pasada 1, se incubaron muestras de una preparación de VRP con monocapas de células Vero durante 1 hora a 37°C , luego, se removieron los fluidos de muestra y se reemplazaron con medio fresco, y se incubaron los cultivos durante 24 horas para permitir la amplificación de cualquier RCV que pudiera estar presente. Para la pasada 2, se añadieron sobrenadantes del cultivo celular al final de la pasada 1 a nuevas monocapas de células Vero y se incubaron a 37°C durante 72 horas. Al final de la pasada 2, se inspeccionaron los cultivos para CPE utilizando un microscopio de luz invertida. Este ensayo ha sido estandarizado y evaluado por la sensibilidad para detectar virus viables en presencia de un gran exceso de VRP. Utilizando ya sea virus V3014 o TC-83 en este ensayo, los estudios con muestras enriquecidas revelaron un límite inferior de detección de 3-8 PFU sobre un fondo de 1×10^8 VRP. Este ensayo ha sido realizado sobre más de 10^{13} VRP producidas con los auxiliares sin promotor de esta invención, y nunca se ha detectado RCV. A pesar del límite de detección de este ensayo, los cálculos teóricos de la frecuencia de recombinación posible para la generación de RCV sería mucho menor usando este límite de detección, es decir, 1 en 10^{10} , 1 en 10^{11} , 1 en 10^{12} , o 1 en 10^{13} VRP.

30 Ejemplo 6. Auxiliares sin promotor de "glicoproteína dividida"

A. Construcción de auxiliares sin promotor de E2 y E1 separados

35 La construcción de auxiliares sin promotor de glicoproteína en los que se colocaron secuencias de codificación de E2 y E1 en auxiliares separados, se realizó mediante la clonación de los casetes de glicoproteína de E2 y E1 por separado en la cadena principal del auxiliar dHgp6-mut1. Los cebadores fueron diseñados para amplificar mediante PCR la región E3-E2 de la cápside de la región de codificación de la proteína estructural de VEE a partir de pHCMV-Vsp (véase patente estadounidense No. 7.045.335. El fragmento amplificado fue clonado en el vector pCR-Blunt II TOPO® (Invitrogen), generando pCR-CE3E2. Se secuenció el casete CE3E2 para garantizar que no se introdujeran errores durante la amplificación por PCR. Para producir un auxiliar asistido por el promotor que contenía la región estructural CE3E2, se digirió el ADN pCR-CE3E2 con la enzima de restricción SpeI para liberar un fragmento E3E2. El fragmento E3E2 (SpeI) fue luego ligado con el auxiliar de la cápside (13.2.2) linealizado con la enzima SpeI para producir pHCE3E2. El auxiliar E2 sin promotor (denominado dHE2-6M1) fue preparado por digestión de la región de codificación E3-E2 de pHCE3E2. El plásmido de ADN pHCE3E2 se linealizó primero con la enzima de restricción AscI y luego tratado con ADN polimerasa T4 para crear un extremo romo. <en forma similar, se linealizó el plásmido de ADN dHgp6-mut1 con la enzima de restricción SphI y se trató con ADN polimerasa T4 para crear un extremo romo. Ambos linealizados se digirieron luego los ADN tratados con polimerasa T4 con la enzima de restricción SpeI, y el fragmento del vector resultante dHgp6-mut1 de 3,6 kb y el fragmento E3-E2 de 1,4 kb fueron cada uno purificado en gel. Los dos fragmentos purificados fueron luego ligados entre sí utilizando ADN ligasa T4 para producir el auxiliar sin promotor dHE2-6M1.

40 La generación de un auxiliar E1 sin promotor se logró en varias etapas. Los cebadores fueron diseñados para amplificar dos fragmentos de secuencia de codificación de la proteína estructural: 1) cápside-E3 (CE3), y 2) 6K-E1 (6KE1). Los productos de la PCR fueron clonados en el vector pCR-Blunt TOPO® (Invitrogen), generando pCR-CE3 y pCR-6KE1. Los clones fueron secuenciados para garantizar que no se introdujeran errores durante la amplificación. Para producir un casete que contenía tanto las secuencias guía E3 y 6K secuencia arriba de la glicoproteína E1, se produjo otro constructo intermedio. Esto se logró mediante digestión del ADN de pCR-6KE1 con la enzima BamHI y purificación del fragmento 6KE1. Se ligó luego el fragmento 6KE1 (BamHI) con ADN de pCR-CE3 linealizado con la enzima BamHI, generando pCR-CE36KE1. Para generar un auxiliar asistido por promotor que contenía el casete CE36KE1, se digirió el

ADN de pCR-CE36KE1 con las enzimas SpeI y SphI liberando el casete de la secuencia que codifica la proteína estructural. Se ligó luego el fragmento CE36KE1 (SpeI/SphI) con el auxiliar de la cápside (13.2.2) linealizado con SpeI y SphI para producir pHCE36KE1. La generación del auxiliar E1 sin promotor (denominado dHE1-6M1) se logró mediante la digestión de la región de codificación de E3-6K-E1 del plásmido pHCE36KE1. Se digirieron los plásmidos de ADN pHCE36KE1 y dHgp6-mut1 con las enzimas de restricción SpeI y SphI y el se purificaron en gel el fragmento resultante del vector dHgp6-mut1 de 3,6 kb y los fragmentos E3-6K-E1 de 1,7 kb. Se ligaron luego entre sí los dos fragmentos purificados utilizando ADN ligasa T4 para producir el auxiliar sin promotor dHE1-6M1.

B. Análisis de los auxiliares sin promotor de la glicoproteína dividida

Los auxiliares de la glicoproteína individual fueron transcritos *in vitro*, y se purificaron las transcripciones de ARN antes de ser sometidas a electroporación en células Vero junto con un ARN del replicón de VEE. Se analizó la replicación del auxiliar mediante transferencia tipo Northern y se analizó la expresión de la proteína mediante IFA utilizando anticuerpos específicos de la glicoproteína E1 y E2. Los resultados del ensayo Northern indican que tanto el auxiliar dHE1-6M1 como dHE2-6M1 se replican en forma eficiente. Una transferencia tipo Northern representativa se muestra en la Figura 3.

Para determinar si los dos auxiliares sin promotor que expresan glicoproteínas individuales podrían combinarse con un auxiliar de la cápside $\Delta 26S$ para empacar un ARN del replicón para producir VRP, se combinaron los tres auxiliares con el ARN del replicón de VEE que expresa un fragmento A de la neurotoxina botulínica y se sometieron a electroporación en células Vero. Los rendimientos de VRP de un experimento se muestran en la Tabla 7.

Ejemplo 7. Casetes auxiliares sin promotor del extremo 5' y 3' modificado

A. Construcción de casetes auxiliares del extremo 5' modificado

La estructura secundaria predicha en el extremo 5' (~ primeros 250 nt) del ARN de la mayoría de los alfavirus contiene cuatro estructuras tallo-bucle (SL) (SL1, SL2, SL3 y SL4). Frolov y colaboradores (RNA, 7: 1638-1651 (2001)) demostró que la remoción de las secuencias de nucleótidos que codifican SL2 a partir de un ARN auxiliar del virus Sindbis aumentó la replicación de ese auxiliar.

La región SL2 en el extremo 5' de VEE (basado en el programa M veces), nt 46 a nt 116 inclusive, fue removida del dHcap6-mut1 por PCR de la siguiente manera. Se amplificaron dos fragmentos del ADN dHcap6-mut1. Se amplificó un fragmento 5' de aproximadamente 1 kilobase (kb) con los cebadores 13-82.1.9 [SEQ ID NO. 83] y dLS2 (EcoRV) R [SEQ ID NO. 84] (Tabla 8) que contenía los 45 nucleótidos en el extremo 5' de dHcap6-mut1 y los nucleótidos que codifican la secuencia de la cadena principal del plásmido. Se amplificó un fragmento 3' de aproximadamente 1,5 kb con los cebadores dSL2 (EcoRV) F [SEQ ID NO. 85] y 3-8.pr4 [SEQ ID NO. 86] (Tabla 8) que contenía la porción del 5' extremo 5' de VEE que comienza con el nucleótido 117 y los nucleótidos que codifican la secuencia completa de la cápside a través del extremo 3' de VEE. Se digirió el fragmento de PCR 5' de ~1 kb con las enzimas de restricción XhoI y EcoRV. Se digirió el fragmento de PCR kb 3' de ~1,5 kb con las enzimas de restricción EcoRV y NotI. Se linealizó el plásmido dHgp6-mut1 por digestión con XhoI y NotI y se purificó la cadena principal del vector resultante de ~2,5 kb. Para generar el nuevo auxiliar en el cual se suprimió la región SL2, denominado en este documento como "dHcap6-mut1 (dSL2)", se ligaron entre sí el fragmento 5' (XhoI/EcoRV) el fragmento 3' (EcoRV/NotI), y el vector linealizado XhoI/NotI. El auxiliar dHcap6-mut1 (dSL2), con un extremo 5' cuya secuencia se proporciona en este documento como la SEQ ID NO. 51, fue completamente secuenciado para garantizar que no se introdujeran errores durante la amplificación por PCR. Para generar la correspondencia del auxiliar dHgp6-mut1 (dSL2), se digirió el ADN de dHgp6 mut1 con las enzimas de restricción XhoI y RsrII y se purificó el fragmento de 5,4 kb. Se recolectó el extremo 5' modificado de dHcap6-mut1 (dSL2) mediante la digestión de este ADN con XhoI y RsrII y purificando el fragmento de 1,1 kb. Estos dos fragmentos fueron ligados entre sí para generar dHgp6-mut1 (dSL2), que tiene el extremo 5' idéntico [SEQ ID NO. 51] a dHcap6-mut1 (dSL2).

B. Construcción de casetes auxiliares sin promotor del extremo 3' acortado.

En estos ejemplos, para los constructos auxiliares de la cápside dHcap(FL), dHcap1 hasta dHcap7, dHcap(FL)mm, dHcap1mm hasta dHcap7mm, dHcap(FL)mut1, y dHcap1mut1 hasta dHcap7mut1, se proporciona en el presente documento la secuencia del extremo 3' como la SEQ ID NO. 55. Aunque los auxiliares de la cápside de VEE de esta invención carecen de la región de codificación de la glicoproteína completa, una pequeña porción de la proteína E3 permanece en el auxiliar de la cápside para permitir que ocurra una escisión del tipo quimotripsina dentro de la célula de empaquetamiento para producir la proteína madura de la cápside. Para los constructos auxiliares de la glicoproteína dHgp(FL), dHgp1 hasta dHgp7, dHgp(FL)mm, dHgp1mm hasta dHgp7mm, dHgp(FL)mut1, y dHgp1mut1 hasta dHgp7mut1, la secuencia del extremo 3' fue una secuencia más corta, ya que no se requiere la secuencia que comprende el sitio de escisión para la generación de la proteína madura de la cápside en los constructos auxiliares de glicoproteína. La secuencia 3' utilizada para estos constructos de glicoproteína en estos ejemplos se proporciona en este documento como la SEQ ID NO. 56.

Además, se construyeron auxiliares de ARN sin promotor con longitudes más cortas del extremo 3'. Al reducir la cantidad de secuencia del extremo 3' de alfavirus, la posibilidad teórica de un segundo evento de recombinación, que sería necesario para generar el virus VEE con capacidad de regeneración, se reduce aún más. Inicialmente, se produjo un auxiliar de glicoproteína con un promotor 26S funcional que contienen sólo los 19 nucleótidos que comprenden la secuencia 3' altamente conservada de alfavirus [SEQ ID NO. 52] en las dos etapas siguientes. En primer lugar, se produjo un plásmido que contenía un casete de la secuencia de codificación de glicoproteína (GP) con sitios de restricción únicos 5' y 3'. Los cebadores fueron diseñados para amplificar la GP de VEE con un sitio único SphI justo después del codón de terminación de E1 en el extremo 3' ("GP (SphI) R", SEQ ID NO. 87, Tabla 8) y un sitio SpeI interno existente en el extremo 5' ("3-16.1.3", SEQ ID NO. 88, Tabla 8). El fragmento amplificado fue TA clonado en ADN de pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) generando pCR2.1/GP 19 nt 5'. En segundo lugar, se diseñó un cebador directo para introducir un sitio SphI justo secuencia arriba de la secuencia conservada de 19 nucleótidos en el extremo 3' de VEE (3' trunc (SphI) F, SEQ ID NO. 89, Tabla 8). Se diseñó un cebador inverso, específico para la secuencia de la cadena principal del plásmido, para amplificar un fragmento que contendría un sitio de restricción AflII único en el extremo 3' (3' trunc (AflII) R, SEQ ID NO. 90, Tabla 8). El fragmento resultante de la amplificación con estos cebadores se digirió con SphI y AflII y se ligó en el auxiliar de glicoproteína 13.4.6 (descrito en el Ejemplo 1), que había sido linealizado con las enzimas de restricción SphI y AflII, lo que resulta en la construcción de Pgp auxiliar-int1. El constructo pGP auxiliar-int1 tiene una región de 72 nucleótidos entre el codón de terminación de GP y el extremo 3' del auxiliar (incluyendo la secuencia de conservadas de 19 nt). Para generar un auxiliar de GP con sólo el extremo 3' de 19 nucleótidos, se digirió el ADN de pCR2.1/GP 19 nt 5' con SpeI y SphI y se digirió la secuencia de codificación de GP ligada en el pGP auxiliar-int1 con enzimas de restricción SpeI y SphI. El constructo resultante se denominó pGP auxiliar 19nt.

A continuación se utilizó el constructo pGP auxiliar 19nt para producir auxiliares Δ 26S con secuencias de reconocimiento de replicación 3' de longitud variable. El constructo pGP auxiliar 19nt fue digerido con las enzimas de restricción NcoI y NotI y el fragmento de 2515 pares de bases que contenía la secuencia de codificación de la glicoproteína con la región del extremo 3' de 19 nt que se purificó en gel. Este fragmento de 2515 pares de bases (NcoI/NotI) se ligó luego en constructos dHgp digeridos con las enzimas de restricción NcoI y NotI, generando los diversos constructos dHgp 19nt.

C. Construcción de un casete auxiliar sin promotor modificado que expresa la proteína de la cápside del alfavirus.

En una célula infectada por el virus de la VEE, la proteína de la cápside de VEE se escinde a sí misma de la poliproteína estructural que se traduce a partir de ARNm subgenómico de 26S. Aunque los auxiliares de la cápside de VEE de esta invención carecen de la región de codificación de la glicoproteína completa, una pequeña porción de la proteína E3 permanece en el auxiliar de la cápside para permitir que ocurra la escisión de tipo quimotripsina dentro de la célula de empaquetamiento para producir la proteína madura de la cápside. La introducción de un codón de terminación en el extremo 3' de la cápside, en lugar del sitio de escisión de tipo quimotripsina, aumentaría la dificultad para producir recombinantes funcionales con un auxiliar de glicoproteína. Es decir, para que se produzca una recombinación funcional (es decir, una que genera un virus con capacidad de replicación) con un auxiliar dHgp de esta invención, el evento de recombinación tendría que ser un nucleótido perfecto para reemplazar el codón de terminación modificado genéticamente en la secuencia de codificación de la cápside y mantener un sitio de escisión de la cápside activo. Se produjeron dos versiones de auxiliares dHcap con codones de terminación incorporados en el extremo 3'. Una versión, dHcap6-mut1-dSL2 (terminación), que tiene una secuencia 3' proporcionada en este documento como la SEQ ID NO: 57, reemplaza el residuo de triptófano del terminal C de la proteína de la cápside nativa con un codón de terminación; la otra versión retuvo el residuo de triptófano del terminal C (dHcap6-mut1 (W-terminación), que tiene una secuencia 3' proporcionada en este documento como la SEQ ID NO: 59) y se insertó un codón de terminación inmediatamente secuencia abajo del residuo de triptófano. La secuencia de codificación de la cápside fue amplificada con cebadores diseñados para modificar genéticamente un sitio RsrII único en el extremo 5' (Cápside (RsrII-Kozak) F, SEQ ID NO: 91, Tabla 8) y un sitio SphI único en el extremo 3' (Cápside (terminación) SphI R, SEQ ID NO: 92 o Cápside (W-terminación) SphI R, SEQ ID NO: 93, Tabla 8). El cebador directo también fue modificado genéticamente para colocar el codón de inicio de la cápside en una secuencia de consenso casi óptima Kozak (Kozak, Cell, 44 (2): 283-292 (1986)) para mejorar la iniciación de traducción del ribosoma del ARNm de la cápside. Las secuencias amplificadas de codificación de la cápside se digirieron con las enzimas de restricción RsrII y SphI y se ligaron en plásmidos auxiliares Δ 26S linealizados con RsrII y SphI para producir los constructos dHcap6-mut1-dSL2 (terminación) y dHcap6-mut1 (W-terminación).

D. Construcción del casete auxiliar del promotor modificado que expresa glicoproteínas de alfavirus.

La proteína de la cápside de VEE es una proteasa similar a la quimotripsina que se escinde después del residuo de triptófano del terminal C de la cápside. Con base en la especificidad de escisión de la quimotripsina, se espera que todos los residuos de aminoácidos sean tolerados en la posición inmediatamente secuencia abajo del triptófano excepto metionina y prolina. Teniendo cualquiera de estos aminoácidos inmediatamente secuencia abajo del triptófano se espera que reduzca en gran medida la actividad de escisión de quimotripsina. En el virus de VEE nativa, hay 18 aminoácidos que componen la secuencia de la señal de E3 de VEE. Los constructos fueron diseñados para reducir el número de aminoácidos en la secuencia de señal de E3 manteniendo al mismo tiempo la función de señalización de la

5 secuencia de E3. Dado que se espera que 16 de los 18 aminoácidos, que comprenden la secuencia de E3 sean tolerados en la posición secuencia abajo del triptófano del terminal C de la cápside, la reducción del número de aminoácidos en la secuencia de señal de E3 reducirá el número de sitios que serían funcionales como sitios de escisión si se colocaran inmediatamente secuencia abajo del triptófano del terminal C tras la ocurrencia de un evento de recombina-
 10 ción perfecta de nucleótidos que reconstituye la secuencia de codificación de la poliproteína estructural de VEE. Como ejemplo de este tipo de enfoque, el residuo de serina del terminal N normalmente presente en la secuencia de señal de E3 fue removido por PCR, dejando un residuo de leucina como el residuo del terminal N, y se construyó un auxiliar sin promotor dHgp para determinar si tal auxiliar gp modificado funcionaría para empaquetar VRP.

10 Se diseñó un cebador de PCR directo (Gp (RsrII-Ser) F, SEQ ID NO: 94) para remover el residuo de serina del terminal N de E3 y mantener un sitio de restricción RsrII único (Tabla 8). Se diseñó un cebador inverso de PCR (3-16.2.14, SEQ ID NO: 95) para amplificar un fragmento gp que contendría un único sitio de restricción SnaBI (Tabla 8). El fragmento de PCR gp resultante fue digerido con RsrII y SnaBI y se ligó en ADN de dHgp6-mut1 digerido con RsrII y SnaBI, generando dHgp6-mut1 (-S).

E. Experimentos de generación de VRP utilizando auxiliares $\Delta 26S$ modificados en 5' y 3'

15 Los auxiliares que contienen combinaciones de las modificaciones descritas anteriormente fueron preparados también. Se analizaron diferentes combinaciones y concentraciones de ARN de los auxiliares sin promotor dHcap y dHgp en experimentos de producción de VRP para determinar que tan efectivamente empaquetarían un ARN del replicón de VEE (ya sea uno que expresa el fragmento A de la neurotoxina botulínica o un HA de influenza). Además, se analizó el efecto de cubrir los auxiliares $\Delta 26S$ sobre los rendimientos de VRP para un subconjunto de las combinaciones
 20 auxiliares. Los ejemplos representativos de los rendimientos de VRP se muestran en las Tablas 9-13 con diferentes combinaciones de auxiliares $\Delta 26S$. El ensayo de potencia para cuantificar la infectividad de VRP y el rendimiento se realiza en cultivos en monocapa de células Vero en placas de 48 pozos mediante dilución en serie de VRP y la incubación con las células Vero durante la noche a 37°C en 5% de CO₂. Después de incubación durante la noche (18-20 horas), se lavaron y fijaron las células y las monocapas fijadas se tiñeron con un anticuerpo primario específico de antígeno seguido de un anticuerpo secundario conjugado con FITC. Las células que contienen los complejos antígeno-anticuerpo marcados con FITC se detectan por microscopía de fluorescencia ultravioleta (Nikon Eclipse TE300). Se cuentan las células individuales positivas al antígeno y se calcula el título, expresado en UI/mL, a partir del volumen de dilución e inoculación conocido.

Ejemplo 8. Auxiliares sin promotor que incorporan un monómero de ubiquitina

30 A. Construcción de auxiliares $\Delta 26S$ que contienen monómeros de ubiquitina

35 En las células eucariotas, se escinden las proteínas fusionadas o etiquetadas con ubiquitina inmediatamente después de su glicina del terminal C mediante hidrolasa celular del terminal carboxilo de ubiquitina (UCH) (Pickart y Rose, J. Biol. Chem. 260: 7.903-7910 (1985)). La colocación de un monómero de la secuencia que codifica ubiquitina en el marco justo secuencia arriba de las secuencias que codifican la cápside y la glicoproteína eliminarán las proteínas de fusión producidas con ciertos constructos auxiliares sin promotor de esta invención (tales fusiones resultantes de múltiples sitios de inicio de la transcripción secuencia arriba del ATG para cada secuencia de codificación de proteína estructural). La eliminación se debe a que todas las proteínas de fusión en el marco incluyen el monómero de ubiquitina, y por lo tanto serán escindidas por UCH, liberando de este modo las proteínas estructurales de VEE de longitud completa sin ninguna secuencia, secuencia de proteína exógena, secuencia arriba. La ubiquitina F (SEQ ID NO: 96) y la ubiquitina R (SEQ ID NO: 97) de los cebadores (Tabla 14) fueron diseñadas para introducir sitios RsrII en los extremos 5' y 3' de la secuencia de codificación del monómero de ubiquitina amplificado, mientras se mantiene la secuencia Arg-Gly-Gly necesaria para la escisión del monómero de ubiquitina por UCH (Figura 4). Estos constructos particulares resultaron en un residuo(s) adicional(es) de aminoácidos del terminal N en cada una de las proteínas estructurales resultantes después de la escisión que no están presentes en las proteínas estructurales nativas (es decir, para el auxiliar de la cápside, una prolina adicional; para el auxiliar de glicoproteína, prolina y treonina adicionales) (Figura 4).

45 La secuencia de codificación de ubiquitina fue amplificada por PCR utilizando Taq polimerasa Pfu (Stratagene) y se clonó en los sitios RsrII únicos de dHcap(FL) y dHgp(FL). Los transformantes fueron detectados para determinar la orientación del inserto de ubiquitina. Los clones de ubiquitina positivos para cápside y glicoproteína, denominados dHcapU y dHgpU, respectivamente (y con secuencias del extremo 5' proporcionadas en este documento como SEQ ID NOS. 53 y 54, respectivamente), fueron aislados y secuenciados para confirmar que no se introdujeron errores en la secuencia de codificación amplificada de ubiquitina. Los ARN para la electroporación fueron transcritos en reacciones separadas de plásmidos dHcapU, dHgpU, dHcap(FL), dHgp(FL), Hcap4, y 13.4.6 utilizando el kit RiboMax Express RNA® y se precipitó con cloruro de litio.

B. Experimentos de generación de VRP utilizando auxiliares $\Delta 26S$ modificados de ubiquitina

55 Las células Vero se sometieron a electroporación con un ARN del replicón de VEE que expresa una glicoproteína del

clado C de VIH ("DU151 gp 160") y combinaciones seleccionadas de auxiliares de la cápside y GP sin promotor en las cantidades indicadas de ARN. En algunos experimentos, se utilizó el auxiliar de la cápside "Hcap4". Este es un auxiliar que tiene un extremo 5' truncado (correspondiente al truncamiento dHcap4 descrito aquí anteriormente), pero conserva la secuencia promotora subgenómica 26S y descrita completamente en la patente estadounidense No. 7.045.335. Las electroporaciones se realizaron a 500 V, 25 μ F, 4 impulsos en una cubeta de 0,4 cm en un volumen de aproximadamente 0,8 ml. Cada electroporación se sembró en una botella de rodillo de 1-850 cm² con 100 ml de Optipro® (Gibco, Carlsbad, CA). Se recogieron VRP a las 18 horas en un filtro de 0,2 μ m con 25 ml de lavado con NaCl 0,5 M. Se tituló el material de lavado de sal de VRP con el anticuerpo de cabra anti-gp120 (que reconoce la proteína gp160 del VIH) a 1: 400. Los resultados de los experimentos de empaquetamiento se muestran en la Tabla 15.

Se realizaron posteriormente las electroporaciones para comparar los títulos de diversos ácidos nucleicos empacados con los auxiliares de la cápside dHcapU o dHcap6-mut1 (W-terminación) combinado con dHgp6-mut1. Se titularon las VRP usando un anticuerpo policlonal específico de nsP2 de VEE (Tabla 16).

C. Expresión de la proteína estructural mediante análisis tipo Western en las células sometidas a electroporación

Se prepararon lisados celulares a partir de las células utilizadas para generar VRP en el estudio de empaquetamiento resumido en la Tabla 16. Los lisados de células de cada muestra se sometieron a electroforesis en geles de Bis-Tris Novex al 4-12% a 200 V, 400 mA en 1X MOPS durante 45 min antes a la transferencia semiseca a PVDF a 400 mA en regulador de transferencia 1X durante 40 min. Las membranas fueron bloqueadas durante la noche en un bloque 1X BMB/TBS. Los anticuerpos primarios eran una dilución 1:500 de GP anti-VEE 1A4A y una dilución 1:1500 de cápside anti-VEE en bloque 1X BMB/TBS. Los resultados de la transferencia tipo Western se muestran en la Figura 5. La glicoproteína expresada a partir de dHgpU se procesó en las formas de GP PE2 y E2 más completamente que la glicoproteína expresada a partir de dHgp(FL). Esto se demuestra por la diferencia en el patrón de proteínas de fusión observado sin la ubiquitina presente en dHgp(FL) (Figura 5, compárense los carriles 3 y 4 en la transferencia tipo Western usando anticuerpo GP). La colocación de la proteína ubiquitina en el terminal N de la proteína de la cápside en el auxiliar dHcapU dio lugar a la desaparición de las proteínas de fusión de la cápside (Figura 5) y un aumento mayor a 2 log en el título de gp160 cuando se empacaron con el auxiliar de glicoproteína 13.4.6 (Tabla 15).

D. Expresión de ARN de la proteína estructural mediante el análisis tipo Northern de células sometidas a electroporación

Se extrajo el ARN celular total de las células utilizadas para generar VRP en el estudio de empaquetamiento resumido en la Tabla 15. Las células fueron lisadas con el reactivo RNAwiz® (Ambion, Inc., Austin, TX), se extrajo con cloroformo, se precipitó, y se sometió a análisis tipo Northern usando sondas específicas de cápside y GP (Figura 6 y Figura 7, respectivamente). Todas las especies de ARN son consistentes con los tamaños esperados de los diversos constructos.

Ejemplo 9. Generación de VRP utilizando constructos auxiliares Δ 26S cubiertos y no cubiertos

A. VRP que expresan las glicoproteínas de diferentes alfavirus

Las VRP fueron producidas usando replicones de VEE que expresan, como el ácido nucleico de interés (NOI), la secuencia de codificación para las glicoproteínas ya sea de VEE (3022), el virus de la encefalitis equina oriental (EEE) (4200) o el virus de la encefalitis equina occidental (WEE) (2100), en los que cada sitio de escisión de furina había sido suprimido. Los plásmidos de ADN que codifican los auxiliares utilizados para generar la VRP fueron linealizados con NotI y transcritos *in vitro* usando un kit T7 RiboMax® (Promega, Madison, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante, y donde se indique, suplementado con análogo de CAP 7,5 mM (Promega). Los auxiliares producidos con análogo de Cap se indican como "+Cap" y aquellos que no tienen análogo de cubierta se indican como "-Cap" en la Tabla 17. Las células Vero se sometieron a electroporación con combinaciones de replicón, auxiliar de cápside y los ARN auxiliares de GP y las VRP fueron producidas como se describe en Ejemplo 5 aquí anteriormente. Los resultados de tres experimentos separados se muestran en las Tablas 17 - 19.

B. VRP que expresan la secuencia de codificación de HA de la cepa Wisconsin de influenza

En este experimento, se variaron las relaciones molares del análogo de Cap con respecto a GTP en las reacciones de transcripción para la producción de los ARN auxiliares Δ 26S que codifican, ya sea la cápside de VEE o glicoproteínas del VEE. Las reacciones de transcripción se ensamblaron de la siguiente forma: regulador de transcripción 5X Promega; mezcla de rNTP (UTP, CTP, ATP 6 mM); GTP (a 0-6 mM, como se indica en la tabla); (Promega Corporation Woods Hollow Rd., Madison WI, catálogo # P1300) y análogo de Cap Ribo m⁷G® (6 mM) (Promega Corporation Woods Hollow Rd., Madison, WI, catálogo # P1712). Las reacciones adicionales se realizaron con regulador 5X de Promega y las rNTP 7,5 mM con y sin análogo de Cap Ribo m⁷G para imitar las condiciones del kit de transcripción de ARN T7 RiboMAX Express® (Promega Corporation Woods Hollow Rd., Madison, WI, catálogo # P1320) especificadas por el fabricante, que normalmente se corre con el regulador 2X suministrado con el kit. El replicón de VEE que fue empaquetado en este experimento codificó la proteína HA de la influenza (A/WI/05). Se utilizaron 30 μ g del replicón de ARN; 10 μ g de un ARN

5 auxiliar de cápside $\Delta 26S$, y 60 μg de un ARN auxiliar de glicoproteína $\Delta 26S$ para cada electroporación. Se expandieron las células Vero, después se lavaron y se resuspendieron en regulador de sacarosa a razón de $1,2 \times 10^8$ células/mL. Estas células se mezclaron con los ARN, luego se sometieron a electroporación con el aparato BioRad Gene Pulse II® ajustado a 500 voltios, 25 μF d y cuatro pulsos. Las células fueron transferidas a botellas de rodillos con 100 mL de OptiPro® y se incubaron a 37°C. Veinticuatro horas después de la electroporación, se recogieron las VRP. Se titularon las VRP en placas de 48 pozos de Vero y los resultados se muestran en la Tabla 25.

Ejemplo 10. Protección contra las neurotoxinas botulínicas en los ratones utilizando las VRP elaboradas con constructos auxiliares $\Delta 26S$

10 Los vectores del replicón de VEE que expresan el fragmento no tóxico del terminal C de la cadena pesada ya sea del serotipo A o B de la neurotoxina botulínica (BoNT A o BoNT B, respectivamente) se empaquetaron en las VRP utilizando: (i) 30 μg cada vez de auxiliares 13.2.2 y 13.4.6 no protegidos, o (ii) 20 μg del auxiliar $\Delta 26S$ de la cápside protegida y 60 μg del auxiliar $\Delta 26S$ de glicoproteína protegida, como se describe en el Ejemplo 5. Estas VRP se utilizaron con una dosis de 1×10^7 UI para vacunar ratones Swiss dos veces en el día 0 y el día 28. Los ratones fueron luego expuestos a 1000 veces la dosis necesaria para matar el 50 por ciento de los animales (1000 DL_{50}) ya sea de la neurotoxina BoNT A o BoNT B un mes después de la segunda inmunización. Los resultados del experimento de exposición se resumen en la Tabla 20.

Ejemplo 11. Estudios de inmunogenicidad y protección con las VRP que expresan antígenos del virus de la viruela

A. Inmunogenicidad en ratones y primates de VRP generada usando constructos auxiliares $\Delta 26S$.

20 Los vectores del replicón de VEE optimizados para expresar cuatro virus vacuna (genes VACV (L1R, B5R, A27L y A33R) se construyeron utilizando el método descrito por Kamrud y colaboradores (Virology 360 (2): 376-87 (2007)). Los cuatro genes VACV se denominan colectivamente como "4pox". Los genes 4pox se clonaron en dos sistemas diferentes del vector del replicón de VEE, uno con base en la cepa 3014 de VEE y el otro con base en la cepa de la vacuna TC-83. Se utilizó cada vector de replicón que expresa la secuencia que codifica VACV optimizado para generar las VRP mediante la combinación de 30 μg del replicón, 20 μg del ARN auxiliar de la cápside $\Delta 26S$, y 60 μg del ARN auxiliar de GP $\Delta 26S$ y la electroporación de los mismos en células Vero. Se produjeron y recolectaron partículas como se describe en el Ejemplo 5. Se combinaron luego las VRP individuales de VACV, produciendo una mezcla de VRP 4pox usada para inmunizar ya sea ratones BALB/c o macacos Cynomolgus y se midieron las respuestas humorales mediante análisis ELISA específico de antígeno de VACV. Las respuestas de ELISA específicas para VACV detectadas en ratones vacunados se muestran en la Tabla 21 y las respuestas de ELISA específicas para VACV detectadas en macacos vacunados se muestran en la Tabla 22.

B. Protección en ratones y primates no humanos utilizando las VRP 4pox

1. Ratones

Se expusieron los ratones por vía intranasal con 2×10^6 PFU de virus vacuna (cepa IHD-J), y los resultados se presentan en la Tabla 23.

35 2. Primates no humanos

Los primates no humanos fueron expuestos por vía intravenosa con 5×10^6 PFU del virus de la viruela del simio. Se utilizó el sistema de puntuación para el recuento de lesiones de la Organización Mundial de la Salud para determinar la gravedad de la enfermedad, y los resultados se presentan en la Tabla 24.

40 Tal como lo comprenderá un experto en la técnica, hay varias formas de realización y elementos para cada aspecto de la invención reivindicada, y todas las combinaciones de diferentes elementos se incorporan en este documento como realizaciones de esta invención, por lo que las combinaciones específicas ejemplificadas en la presente memoria no deben interpretarse como limitaciones al alcance de la invención como se reivindica. Si se remueven o añaden elementos específicos al grupo de los elementos disponibles en una combinación, entonces se considera que el grupo de elementos tiene incorporado dicho cambio.

45 Tabla 1. Cebadores para generar auxiliares $\Delta 26S$

Nombre del cebador	5' secuencia del cebador 3'	SEQ ID NO:
Cápside F	CCTCGGACCGATGTTCCCGTTCCAGCCAATG	98

GP F	CCTCGGACCGACCATGTCACTAGTGACCACCATG	60
13-101.pr4	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTGAAATATTA AAAACAAAATCCGATTCGG	61
3-16.1.1	ACCGTCACCCTGGATGCTGT	62
dHelp1 R	CCTCGGACCGAAACAGCGACTTGCCCTTCGTAGC GACAC	63
dHelp2 R	CCTCGGACCGCATAGTCTCAGTTTCCAGGTCAGGG TCGC	64
dHelp3 R	CCTCGGACCGCGGCGAGCTCCTTCATTTTCTTGTG CAATTCCT	65
dHelp4 R	CCTCGGACCGCAGCTTAGTTGCATACTTATACAAT CTGTCCGGA	66
dHelp5 R	CCTCGGACCGACATCTCATCGGACAGATACAATG ATACTTGTGCT	67
dHelp6 R	CCTCGGACCGTCCAATGTCAAAGGATCOTGTCCGAT GGGT	68
dHelp7 R	CCTCGGACCGAGTTTTGAAGCCAGATGCGAAAAC GCTCTG	69
dHelp8 R	CCTCGGACCGCTTGGCTTCTACCTCAAACCTGCGGG AAGC	70

Tabla 2. Análisis IFA de los auxiliares dHcap 1-8

Auxiliar	IFA anticápside
dHcap 1	Positivo
dHcap 2	Positivo
dHcap 3	Positivo
dHcap 4	Positivo
dHcap 5	Positivo
dHcap 6	Positivo
dHcap 7	Positivo
dHcap 8	Positivo (débil)

Tabla 3

Auxiliar	IFA Anti-GP
DHgp 1	Positivo
DHgp 2	Positivo
DHgp 3	Positivo
DHgp 4	Positivo
DHgp 5	Positivo
DHgp 6	Positivo
DHgp 7	Positivo
DHgp 8	Negativo

Tabla 4. Cebadores para mutagénesis dirigida al sitio para generar auxiliares mut1

Nombre del cebador	5' secuencia del cebador 3'	SEQ ID NO
Mut1 F	GACCAATTACCTACCCAAATAGGAGAAAAGTTCACGT TGAC	71
Mut1 R	GTCAACGTGAACTTTCTCCTATTTGGGTAGGTAATTG GTC	72

Tabla 5. Cebadores usados para cambiar los codones ATG de la secuencia de reconocimiento de la replicación 5' por GTC

Nombre del cebador (ubicación de un residuo de A en el codón ATG)	5' secuencia del cebador 3'	SEQ ID NO
nt-12	ATAGGCGGCGCGTGAGAGAAGCCAG	73
nt-45	CCTACCCAAAGTGGAGAAAAGTTCACGTTG ACATC	74
nt-148/154/160	CAGGTCACTGATAGTGACCGTGCTAGTGC CAGAGCG	75
nt-259	GCCCGCCCGCAGAGTGTATTCTAAGCAC	76
nt-295/300	GTATCTGTCCGGTGAAGTGTGCGGAAAGAT CCG	77
nt-331	GACAGATTGTATAAAGTGTGCAACTAAGCT G	78
nt-390	GAATGGACAAGAAAGTGAAGGAGCTC	79
nt-411	CCGTCTGAGCGACCCTGACCTGGAAC	80

ES 2 588 906 T3

nt-441	GAAACTGAGACTGTGTGCCTCCACG	81
nt-499	GTTTACCAGGGTGTATACGCGGTTG	82

Tabla 6

Replicón BoNT B		
Auxiliar de la cápside	Auxiliar de GP	Rendimiento de VRP
dHcap6mut1 (30 µg)	13.4.6 (30 µg)	9,0 x 10 ⁹
Replicón BoNT A		
Auxiliar de la cápside	Auxiliar de GP	Rendimiento de VRP
dHcap6 (30 µg)	dHgp7 (30 µg)	6,0 x 10 ⁹
dHcap6 (30 µg)	dHgp7 (90 µg)	2,6 x 10 ¹⁰
Replicón de BoNT A		
Auxiliar de cápside	Auxiliar de GP	Rendimiento de VRP
dHcap5-mm (30 µg)	dHgp mut1 (90 µg)	1,8 x 10 ⁷
dHcap6-mm (30 µg)	dHgp mut1 (90 µg)	3,6 x 10 ⁸
dHcap7-mm (30 µg)	dHgp mut1 (90 µg)	1,3 x 10 ⁸
dHcap4-mm (30 µg)	dHgp mut1 (90 µg)	1,3 x 10 ⁹
dHcap6- mm (30 µg)	dHgp mut1 (90 µg)	4,6 x 10 ⁹
dHcap7-mm (30 µg)	dHgp mut1 (90 µg)	6,2 x 10 ⁹
dHcap5-mm (10 µg)	dHgp mut1 (90 µg)	4,2 x 10 ⁶
dHcap6-mm (10 µg)	dHgp6 mut1 (90 µg)	2,6 x 10 ⁸
dHcap7-mm (10 µg)	dHgp6 mut1 (90 µg)	4,4 x 10 ⁷
dHcap4-mm (10 µg)	dHgp6 mut1 (90 µg)	1,1 x 10 ¹⁰
dHcap6-mm (10 µg)	dHgp6 mut1 (90 µg)	1,9 x 10 ¹⁰
dHcap7-mm (10 µg)	dHgp6 mut1 (90 µg)	1,8 x 10 ¹⁰
Replicón de SARS S		

ES 2 588 906 T3

Auxiliar de cápside	Auxiliar de GP	Rendimiento de VRP
dHcap4 mut1 (10 µg)	dHgp6 mut1 (90 µg)	4,4 x 10 ⁹
dHcap6 mut1 (10 µg)	dHgp6 mut1 (90 µg)	2,6 x 10 ⁹
dHcap7 mut1 (10 µg)	dHgp6 mut1 (90 µg)	1,4 x 10 ⁹
Replicón de BoNT A		
Auxiliar de cápside	Auxiliar de GP	Rendimiento de VRP
dHcap1 (30 µg)	13.4.6 (30 µg)	3,0 X 10 ⁷
dHcap2 (30 µg)	13.4.6 (30 µg)	9,2 X 10 ⁷
dHcap3 (30 µg)	13.4.6 (30 µg)	2,0 X 10 ⁸
dHcap4 (30 µg)	13.4.6 (30 µg)	1,3 X 10 ⁹
dHcap5 (30 µg)	13.4.6 (30 µg)	3,2 X 10 ⁸
dHcap6 (30 µg)	13.4.6 (30 µg)	3,0 X 10 ⁸
dHcap7 (30 µg)	13.4.6 (30 µg)	1,2 X 10 ⁹
dHcap8 (30 µg)	13.4.6 (30 µg)	1,8 X 10 ⁷
dHcap6 mut1 (30 µg)	13.4.6 (30 µg)	8,4 X 10 ⁹
dHcap6 mut1 (30 µg)	13.4.6 (30 µg)	1,2 X 10 ¹⁰

Tabla 7. Rendimiento de VRP generadas usando la cápside Δ26S, auxiliares de E1 y E2

pERK/342/MS/BoNT A [30 µg]			
Auxiliar de la cápside	Auxiliar de GP #1	Auxiliar de GP #2	Título de VRP /ml
dHcap6-mut1 [10 µg]	dHE1-6M1 [30 µg]	dHE2-6M1 [30 µg]	2,2 x 10 ⁷
dHcap6-mut1 [10 µg]	dHgp7-mut1 [90 µg]		1,3 x 10 ⁹

Tabla 8. Cebadores de PCR usados para diseñar modificaciones a las regiones 5' y 3' de auxiliares Δ26S

Nombre del cebador	5' secuencia del cebador 3'	SEQ ID NO:
13-82.1.9	TCAGTGGAAACGAAACTCACG	83
dSL2(EcoRV) R	TTTGATATCGGTAATTGGTCTGGGCTTCTC	84
dSL2 (EcoRV) F	TTTGATATCGAAGCCAAGCAGGTCAGT	85
3-8.pr4	GCAACGCGGGGAGGCAGACA	86

ES 2 588 906 T3

GP (SphI) R	GCATGCTCAATTATGTTTCTGGTTGG	87
3-16.1.3	CGACATAGTCTAGTCCGCCA	88
3' trunc (SphI) F	GCATGCATTTTGTTTTAAATATTTCAA	89
3' trunc (AflII) R	GCTCACATGTTCTTTCCTGCG	90
Cápside (RsrII-Kozak) F	CCTCGGACCGACCATGTTCCCGTTCCAGCC AATG	91
Cápside (terminación) SphI R	ACATGCATGCTTATTGCTCGCAGTTCTCCGG	92
Cápside (W-terminación) SphI R	ACATGCATGCTTACCATTGCTCGCAGTTCTC CGG	93
Gp (RsrII-Ser) F	CCTCGGTCCGACCATGCTAGTGACCACCAT G	94
3-16.2.14	ACATACACGGTAGTCACAAT	95

Tabla 9.

pERK/342/MSBoNT A empaquetado en replicón [30 µg de ARN]		
Auxiliar de cápside [ARN]	Auxiliar de GP [ARN]	Título de VRP IFU/ml
dHcap7- mut1 (W-terminación) [10 µg]	dHgp7-mut1 [90 µg]	1,0 x10 ⁸
dHcap6- mut1 (W- terminación) [10 µg]	dHgp7-mut1 [90 µg]	8,9 x10 ⁸
dHcap7- mut1 (W- terminación) [20 µg]	dHgp7-mut1 [90 µg]	3,0 x 10 ⁸
dHcap6- mut1 (W- terminación) [20 µg]	dHgp7-mut1 [90 µg]	6,8 x 10 ⁸

Tabla 10.

pERK/342/MSBoNT A empaquetado en replicón [30 µg ARN]		
Auxiliar de cápside [ARN]	Auxiliar de GP [ARN]	Título de VRP IFU/ml
dHcap6-mut1 [10 µg]	dHgp7-mut1 [60 µg]	2,1 x 10 ⁸
dHcap6-mut1 (W-terminación) [10 µg]	dHgp7-mut1 [60 µg]	2,0 x 10 ⁸
dHcap6-mut1 (W-terminación)-dSL2 [10 µg]	dHgp7-mut1 [60 µg]	3,7 x 10 ⁷

Tabla 11.

pERK/342/MSBoNT A empaquetado en replicón [30 µg ARN]

ES 2 588 906 T3

Auxiliar de cápside [ARN]	Auxiliar de GP [ARN]	Título de VRP IFU/ml
dHcap7- mut1 [20 µg]	dHgp7-mut1 [90 µg]	4,9 x 10 ⁷
dHcap7- mut1 19 nt [30 µg]	dHgp7-mut1 [90 µg]	2,2 x 10 ⁷

Tabla 12.

pERK/342/MSBoNT A empaquetado en replicón [30 µg ARN]		
Auxiliar de cápside [ARN] [10 µg]	Auxiliar de glicoproteína [ARN] [60 µg]	Título de VRP IFU/ml
dHcap7- mut1 (W-terminación)	dHgp6-mut 1	6,1 x 10 ⁶
dHcap7- mut1 (W- terminación)	dHgp6- mut1-dSL2 (-S)	6,6 x 10 ⁵
dHcap7- mut1 (W- terminación)	dHgp6- mut1-dSL2 (-S) 19 nt	9,6 x 10 ⁴
dHcap7- mut1 (W- terminación)	dHgp6- mut1 (-S)	1,0 x 10 ⁷
dHcap6- mut1 (W- terminación)	dHgp6-mut1	12,7 x 10 ⁷
dHcap6- mut1 (W- terminación)	dHgp6- mut1-dSL2 (-S)	1,7 x 10 ⁶
dHcap6- mut1 (W- terminación)	dHgp6- mut1-dSL2 (-S) 19 nt	1,2 x 10 ⁵
dHcap6- mut1 (W- terminación)	dHgp6- mut1 (-S)	2,2 x 10 ⁷

Tabla 13.

pERK/383/MS/HA (A Wyoming) [30 µg ARN]		
Auxiliar de cápside [ARN]	Auxiliar de GP [ARN]	Título de VRP IFU/ml
dHcap6-mut1 (W-terminación) [20 µg]	dHgp6-mut1 [60 mg]	2,0 x 10 ⁸
dHcap6-mut1 (W-terminación) protegido [20 µg]	dHgp6-mut1 protegido [60 µg]	9,0 x 10 ⁹
dHcap6-mut1 (W-terminación) [10 µg]	dHgp6-mut1 [90 µg]	2,5 x 10 ⁷
dHcap6-mut1 (W-terminación) protegido [10 µg]	dHgp6-mut1 protegido [90 µg]	2,5 x 10 ⁸
dHcap6-mut1 (W-terminación) [10 µg]	dHgp6-mm [90 µg]	2,3 x 10 ⁷
dHcap6-mut1 (W-terminación) protegido [10 µg]	dHgp6-mm protegido [90 µg]	2,4 x 10 ⁸

Tabla 14.

Nombre del cebador	5' secuencia del cebador 3'	SEQ ID NO:
Ubiquitina F	CATCGACGGACCGATGCAGATCTTCGTGAAGA CCC	96

Ubiquitina R	GATTTTCGGTCCGCCCTCAGACGGAGGACCA GG	97
--------------	---------------------------------------	----

Tabla 15. Generación de VRP usando combinaciones de auxiliares $\Delta 26S$ modificados con ubiquitina

ARN de replicón [30 μ g]	Auxiliar de la cápside	Auxiliar de glicoproteína [60 μ g]	Título de VRP /ml
DU151gp160	dHcap(FL) [10 μ g]	13.4.6	$8,3 \times 10^5$
DU151gp160	dHcapU [10 μ g]	13.4.6	$1,3 \times 10^8$
DU151gp160	Hcap4 [30 μ g]	dHgp6-mut1	$9,3 \times 10^7$
DU151gp160	dHcap6-mut 1 (W-terminación) [10 μ g]	13.4.6	$5,6 \times 10^8$

Tabla 16. Generación de VRP usando múltiples vectores de replicón y combinaciones de auxiliares $\Delta 26S$ modificados

ARN de replicón [30 μ g]	Auxiliar de la cápside [10 μ g]	Auxiliar de GP [60 μ g]	Título de VRP /ml
BoNT A	dHcapU	dHgp6-mut1	$1,4 \times 10^8$
BoNT A	dHcap6-mut1 (W-terminación)	dHgp6-mut1	$3,6 \times 10^8$
BoNT E	dHcapU	dHgp6-mut1	$3,2 \times 10^7$
BoNT E	dHcap6-mut1 (W- terminación)	dHgp6-mut1	$1,4 \times 10^8$
HA (A Wyoming)	dHcapU	dHgp6-mut1	$3,8 \times 10^8$
HA (A Wyoming)	dHcap6-mut1 (W- terminación)	dHgp6-mut1	$6,4 \times 10^8$
NA (A Wyoming)	dHcapU	dHgp6-mut1	$4,0 \times 10^8$
NA (A Wyoming)	dHcap6-mut1 (W- terminación)	dHgp6-mut1	$5,3 \times 10^8$
CEA	dHcapU	dHgp6-mut1	$2,0 \times 10^8$
CEA	dHcap6-mut1 (W- terminación)	dHgp6-mut1	$3,1 \times 10^8$

Tabla 17. Comparación del uso de auxiliares protegidos y no protegidos

NOI en replicón de VEE	Auxiliares	+/- Cap	IU/célula
Glicoproteína de VEE 3022	13.2.2; 13.4.6	- Cap	131,1
Glicoproteína de VEE 3022	13.2.2; 13.4.6	+ Cap	1095,4
Glicoproteína de VEE 3022	Auxiliares $\Delta 26S$ (C & GP)	- Cap	49,0
Glicoproteína de VEE 3022	Auxiliares $\Delta 26S$ (C & GP)	+ Cap	508,8

ES 2 588 906 T3

Glicoproteína de EEE 4200	13.2.2; 13.4.6	- Cap	30,7
Glicoproteína de EEE 4200	13.2.2; 13.4.6	+ Cap	398,8
Glicoproteína de EEE 4200	Auxiliares Δ26S (C & GP)	- Cap	9,3
Glicoproteína de EEE 4200	Auxiliares Δ26S (C & GP)	+ Cap	88,0

Tabla 18

NOI en replicón de VEE	Auxiliares	+/- Cap	IU/célula
Glicoproteína de VEE 3022	13.2.2; 13.4.6	- Cap	600,4
Glicoproteína de VEE 3022	13.2.2; 13.4.6	+ Cap	2035,0
Glicoproteína de VEE 3022	Auxiliares Δ26S (C & GP)	- Cap	101,3
Glicoproteína de VEE 3022	Auxiliares Δ26S (C & GP)	+ Cap	884,6
Glicoproteína de EEE 4200	13.2.2; 13.4.6	- Cap	75,2
Glicoproteína de EEE 4200	13.2.2; 13.4.6	+ Cap	898,3
Glicoproteína de EEE 4200	Auxiliares Δ26S (C & GP)	- Cap	29,8
Glicoproteína de EEE 4200	Auxiliares Δ26S (C & GP)	+ Cap	206,3

Tabla 19.

NOI en replicón de VEE	Auxiliar de la cápside Δ26S (+/-cap)	Auxiliar de GP Δ26S (+/- cap)	IU/célula
Glicoproteína de WEE 2100	-cap	- cap	37,1
Glicoproteína de WEE 2100	+ cap	+ cap	285,7
Glicoproteína de WEE 2100	+ cap	- cap	38,6
Glicoproteína de WEE 2100	- cap	+ cap	34,3

Tabla 20. Resultados de la exposición de ratones vacunados con VRP producidas usando auxiliares Δ26S

Replicón (conjunto auxiliar)	Supervivencia BoNT-A / total	Supervivencia BoNT-B/ total
MS/342BoNT A (13.2.2 + 13.4.6)	8/10	NA
MS/342BoNT A (Δ26S cápside + gp)	10/10	NA
Control VRP1	0/10	NA
MS/357/BoNT B (13.2.2 + 13.4.6)	NA	10/10

ES 2 588 906 T3

MS/357/BoNT B ((Δ26S cápside + gp)	NA	8/10
VRP ¹ de control	NA	0/10
NA: no aplicable		
¹ Contiene secuencia de codificación que expresa proteína irrelevante en el replicón		

Tabla 21.

Replicón que expresa 4pox	Dosis (IU)	Log10 del título por ELISA específico de VACV			
		L1R	B5R	A27L	A33R
V3014	1 x 10 ⁶	2	3	1	3
TC-83	1 x 10 ⁶	3	4	1	4
V3014	1 x 10 ⁷	3	4	3	4
TC-83	1 x 10 ⁷	4	4	1	4

Tabla 22.

Replicón que expresa 4pox	Dosis (IU)	Log10 del título por ELISA específico de VACV			
		L1R	B5R	A27L	A33R
TC-83	1 x 10 ⁸	3,2	2,4	2,2	3,2
V3014	1 x 10 ⁸	3,6	2,6	2	3,6

Tabla 23. Estudio de protección en ratones

Vacuna de VRP	# ratones analizados	% de supervivencia
V3014 4pox	48	100%
V3014 control	24	0%
TC-83 4pox	40	100%
TC-83 control	24	9%

Tabla 24. Estudio de protección en macacos

Vacuna	Sistema de VRP	Animal #	Resultado de la exposición *	Recuento máximo de picaduras
4pox VRP	V3014	1	Sin enfermedad	0

ES 2 588 906 T3

		2	Enfermedad leve	2
		3	Enfermedad leve	8
		4	Enfermedad leve	4
		5	Enfermedad leve	12
4pox VRP	TC-83	1	Sin enfermedad	0
		2	Enfermedad leve	8
		3	Enfermedad leve	12
		4	Enfermedad leve	10
Control VRP	V3014	1	Enfermedad letal	TNTC ¹
		2	Enfermedad letal	TNTC
		3	Enfermedad letal	TNTC
Control VRP	TC-83	1	Enfermedad letal	TNTC
		2	Enfermedad grave	TNTC
		3	Enfermedad severa	>100
¹ TNTC = muy numerosas para ser contadas				

Tabla 25. Estudio de los efectos de la protección de los auxiliares $\Delta 26S$ en el empaquetamiento de un vector de replicón de alfavirus que codifica la secuencia de codificación de HA de la cepa Wisconsin de la influenza

EP	Regulador usado en reacciones de transcripción <i>in vitro</i>	Relación Cap : GTP		Título IU/mL	Total IU	IU/célula
		Cápside	GP			
1	5X	0:1	0:1	3,70E+08	9,26E+09	154
2	5X	1:1	0:1	4,66E+08	1,16E+10	194
3	5X	2:1	0:1	3,52E+08	8,80E+09	147
4	5X	4:1	0:1	3,70E+08	9,26E+09	154
5	5X	6:1	0:1	3,81E+08	9,54E+09	159
6	5X	0:1	1:1	1,91E+08	4,77E+09	79
7	5X	1:1	1:1	4,44E+08	1,11E+10	185
8	5X	2:1	1:1	4,88E+08	1,22E+10	203
9	5X	4:1	1:1	4,36E+08	1,09E+10	182

ES 2 588 906 T3

10	5X	6:1	1:1	4,36E+08	1,09E+10	182
11	5X	0:1	2:1	1,17E+08	2,93E+09	49
12	5X	1:1	2:1	3,04E+08	7,61E+09	127
13	5X	2:1	2:1	3,04E+08	7,61E+09	127
14	5X	4:1	2:1	3,37E+08	8,44E+09	141
15	5X	6:1	2:1	4,14E+08	1,04E+10	173
16	5X	0:1	4:1	1,71E+08	4,26E+09	71
17	5X	1:1	4:1	7,56E+08	1,89E+10	315
18	5X	4:1	4:1	4,66E+08	1,16E+10	194
19	5X	0:1	6:1	1,72E+08	4,31E+09	72
20	5X	6:1	6:1	4,03E+08	1,01E+10	168
21	5X	1:1	0:1	4,36E+08	1,09E+10	182
22	5X	0:1	1:1	1,60E+08	3,99E+09	66
23	5X	2:1	2:1	5,10E+08	1,27E+10	212
24	2X	0:1 (7,5 mM)	1:1 (7,5 mM)	1,80E+08	4,49E+09	75
25	2X	1:1 (7,5 mM)	0:1 (7,5 mM)	3,56E+08	8,89E+09	148
26	5X	1:1 (7,5 mM)	1:1 (7,5 mM)	6,82E+08	1,71E+10	284
27	2X	1:1 (7,5 mM)	1:1 (7,5 mM)	7,04E+08	1,76E+10	293
28	2X	1:1 (7,5 mM)	1:1 (7,5 mM)	6,24E+08	1,56E+10	260
29	2X	0:1 (7,5 mM)	0:1 (7,5 mM)	3,30E+08	8,25E+09	138
30	2X	0:1 (7,5 mM)	0:1 (7,5 mM)	3,41E+08	8,53E+09	142

Listado de secuencias

<110> AlphaVax, Inc.

Kamrud, Kurt I.

Smith, Johnathan F.

5 Maughan, Maureen

<120> CASETES SIN PROMOTOR PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DE ALFAVIRUS

<130> 9368.9.WO

<150> US 60/936.637

<151> 2007-06-21

10 <160> 98

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 521

<212> ADN

15 <213> Virus de la encefalitis equina venezolana

<400> 1

```

atgggcggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaaatggag aaagttcacg 60
ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc cgcagtttg 120
aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc 180
tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240
gtgcgcccgc cgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat 300
gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg 360
aaataactga taaggaattg gacaagaaa tgaaggagct cgccgccgtc atgagcgacc 420
ctgacctgga aactgagact atgtgcctcc acgacgacga gtcgtgtcgc tacgaagggc 480
aagtegctgt ttaccaggat gtatacgcgg ttgacggacc g 521

```

<210> 2

<211> 499

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

ES 2 588 906 T3

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 2

```

ataggcggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaaatggag aaagtccacg      60
ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc cgcagtttg      120
aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc      180
tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa      240
gtgcgcccgc cgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat      300
gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg      360
aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgccgtc atgagcgacc      420
ctgacctgga aactgagact atgtgcctcc acgacgacga gtcgtgtcgc tacgaagggc      480
aagtcgctgt ttcggtccg                                     499
    
```

5 <210> 3

<211> 450

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 3

```

ataggcggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaaatggag aaagtccacg      60
ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc cgcagtttg      120
aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgteagagcg ttttcgcatc      180
tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa      240
gtgcgcccgc cgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat      300
gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg      360
aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgccgtc atgagcgacc      420
ctgacctgga aactgagact atgcggteccg                                     450
    
```

<210> 4

<211> 412

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 4

```

ataggcggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaaatggag aaagtccacg      60
ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc cgcagtttg      120
aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcac      180
tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa      240
gtgcgcccgc cgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat      300
gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg      360
aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgcggtc cg              412
    
```

5 <210> 5

<211> 351

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 5

```

ataggcggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaaatggag aaagtccacg      60
ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc cgcagtttg      120
aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcac      180
tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa      240
gtgcgcccgc cgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat      300
gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgcgggtcc g              351
    
```

<210> 6

<211> 309

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 6

ES 2 588 906 T3

ataggcggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaaatggag aaagttcacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240
 gtgcgcccgc ccgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat 300
 gtcggaccg 309

<210> 7

<211> 248

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 7

ataggcggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaaatggag aaagttcacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggac 240

10 ggtccgcg 248

<210> 8

<211> 200

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 8

ataggcggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaaatggag aaagttcacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc 180
 tggcttcaaa actcgggtccg 200

<210> 9

<211> 141

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 9

atagggcggcg	catgagagaa	gccagacca	attacctacc	caaatggag	aaagttcacg	60
ttgacatcga	ggaagacagc	ccattcctca	gagctttgca	gcggagcttc	ccgcagtttg	120
aggtagaagc	caagcggccc	g				141

<210> 10

<211> 524

10 <212> ADN

<213> Virus de la encefalitis equina venezolana

<400> 10

atgggcggcg	catgagagaa	gccagacca	attacctacc	caaatggag	aaagttcacg	60
ttgacatcga	ggaagacagc	ccattcctca	gagctttgca	gcggagcttc	ccgcagtttg	120
aggtagaagc	caagcaggtc	actgataatg	accatgctaa	tgccagagcg	ttttcgcac	180
tggcttcaaa	actgatcgaa	acggaggctg	acccatccga	cacgatcctt	gacattggaa	240
gtgcgcccgc	ccgcagaatg	tattctaagc	acaagtatca	ttgtatctgt	ccgatgagat	300
gtgcggaaga	tccggacaga	ttgtataagt	atgcaactaa	gctgaagaaa	aactgtaagg	360
aaataactga	taaggaattg	gacaagaaaa	tgaaggagct	cgccgccgtc	atgagcgacc	420
ctgacctgga	aactgagact	atgtgcctcc	acgacgacga	gtcgtgtcgc	tacgaagggc	480
aagtcgctgt	ttaccaggat	gtatacgcgg	ttgacggacc	gacc		524

<210> 11

15 <211> 502

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

20 <400> 11

ES 2 588 906 T3

atagggcggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaaatggag aaagtccacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240
 gtgcgcccgc ccgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat 300
 gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg 360
 aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgccgtc atgagcgacc 420
 ctgacctgga aactgagact atgtgcctcc acgacgacga gtcgtgtcgc tacgaagggc 480
 aagtcgctgt ttcgggccga cc 502

<210> 12

<211> 453

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 12

atagggcggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaaatggag aaagtccacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240
 gtgcgcccgc ccgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat 300
 gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg 360
 aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgccgtc atgagcgacc 420
 ctgacctgga aactgagact atgcgggccg acc 453

10 <210> 13

<211> 415

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 13

ataggcggcg	catgagagaa	gcccagacca	attacctacc	caaaatggag	aaagttcacg	60
ttgacatcga	ggaagacagc	ccattcctca	gagctttgca	gcggagcttc	ccgcagtttg	120
aggtagaagc	caagcaggtc	actgataatg	accatgctaa	tgccagagcg	ttttcgcatac	180
tggcttcaaa	actgatcgaa	acggaggtgg	acccatccga	cacgatcctt	gacattggaa	240
gtgcgcccgc	ccgcagaatg	tattctaagc	acaagtatca	ttgtatctgt	ccgatgagat	300
gtgcggaaga	tccggacaga	ttgtataagt	atgcaactaa	gctgaagaaa	aactgtaagg	360
aaataactga	taaggaattg	gacaagaaaa	tgaaggagct	cgccgcggtc	cgacc	415

<210> 14

<211> 354

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 14

ataggcggcg	catgagagaa	gcccagacca	attacctacc	caaaatggag	aaagttcacg	60
ttgacatcga	ggaagacagc	ccattcctca	gagctttgca	gcggagcttc	ccgcagtttg	120
aggtagaagc	caagcaggtc	actgataatg	accatgctaa	tgccagagcg	ttttcgcatac	180
tggcttcaaa	actgatcgaa	acggaggtgg	acccatccga	cacgatcctt	gacattggaa	240
gtgcgcccgc	ccgcagaatg	tattctaagc	acaagtatca	ttgtatctgt	ccgatgagat	300
10 gtgcggaaga	tccggacaga	ttgtataagt	atgcaactaa	gctgcggacc	gacc	354

<210> 15

<211> 312

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 15

ES 2 588 906 T3

atagggcggcg catgagagaa gcccagacca attacctacc caaaatggag aaagttcacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca ggggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcac 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240
 gtgdcgccgc ccgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat 300
 gtcggaccga cc 312

<210> 16

<211> 249

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 16

atagggcggcg catgagagaa gcccagacca attacctacc caaaatggag aaagttcacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca ggggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcac 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggac 240
 ggtecgacc 249

10 <210> 17

<211> 203

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 17

atagggcggcg catgagagaa gcccagacca attacctacc caaaatggag aaagttcacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca ggggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcac 180
 tggcttcaaa actcgggtccg acc 203

<210> 18

<211> 144

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 18

atagggcggcg	catgagagaa	gccagacca	attacctacc	caaatggag	aaagttcacg	60
ttgacatcga	ggaagacagc	ccattcctca	gagctttgca	gcggagcttc	ccgcagtttg	120
aggtagaagc	caagcggacc	gacc				144

<210> 19

<211> 521

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 19

atgggcggcg	cgtgagagaa	gccagacca	attacctacc	caaagtggag	aaagttcacg	60
ttgacatcga	ggaagacagc	ccattcctca	gagctttgca	gcggagcttc	ccgcagtttg	120
aggtagaagc	caagcaggtc	actgatagtg	accgtgctag	tgccagagcg	ttttcgcatac	180
tggcttcaaa	actgatcgaa	acggaggtgg	acccatccga	cacgatcctt	gacattggaa	240
gtgcgcccgc	ccgcagagtg	tattctaagc	acaagtatca	ttgtatctgt	ccggtgaggt	300
gtgcggaaga	tccggacaga	ttgtataagt	gtgcaactaa	gctgaagaaa	aaactgtaagg	360
aaataactga	taaggaattg	gacaagaaag	tgaaggagct	cgccgcccgc	gtgagcgacc	420
ctgacctgga	aaactgagact	gtgtgcctcc	acgacgacga	gtcgtgtcgc	tacgaagggc	480
aagtcgctgt	ttaccagggt	gtatacgcgg	ttgacggacc	g		521

<210> 20

<211> 499

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

ES 2 588 906 T3

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 20

```

atagggcggcg cgtgagagaa gccagacca attacctacc caaagtggag aaagttcacg      60
ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg      120
aggtagaagc caagcaggtc actgatagtg accgtgctag tgccagagcg ttttcgcatc      180
tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa      240
gtgcgcccgc ccgcagagtg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccggtgaggt      300
gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt gtgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg      360
aaataactga taaggaattg gacaagaaag tgaaggagct cgccgccgtc gtgagcgacc      420
ctgacctgga aactgagact gtgtgcctcc acgacgacga gtcgtgtcgc tacgaagggc      480
aagtcgctgt ttcggtccg                                     499
    
```

<210> 21

5 <211> 450

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

10 <400> 21

```

atgggcggcg cgtgagagaa gccagacca attacctacc caaagtggag aaagttcacg      60
ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg      120
aggtagaagc caagcaggtc actgatagtg accgtgctag tgccagagcg ttttcgcatc      180
tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa      240
gtgcgcccgc ccgcagagtg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccggtgaggt      300
gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt gtgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg      360
aaataactga taaggaattg gacaagaaag tgaaggagct cgccgccgtc gtgagcgacc      420
ctgacctgga aactgagact atgcggtccg                                     450
    
```

<210> 22

<211> 412

15 <212> ADN

<213> Artificial

ES 2 588 906 T3

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 22

```
atggggcggcg cgtgagagaa gccagacca attacctacc caaagtggag aaagttcacg 60
ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc cgcagtttg 120
aggtagaagc caagcaggtc actgatagtg accgtgctag tgccagagcg ttttcgcatc 180
tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240
gtgcgcccgc cgcagagtg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccggtgaggt 300
gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt gtgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg 360
aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgcggtc cg 412
```

5 <210> 23

<211> 351

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 23

```
atggggcggcg cgtgagagaa gccagacca attacctacc caaagtggag aaagttcacg 60
ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc cgcagtttg 120
aggtagaagc caagcaggtc actgatagtg accgtgctag tgccagagcg ttttcgcatc 180
tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240
gtgcgcccgc cgcagagtg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccggtgaggt 300
gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgcggtcc g 351
```

<210> 24

<211> 309

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 24

ES 2 588 906 T3

atgggcggcg cgtgagagaa gcccagacca attacctacc caaagtggag aaagtccacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcgagcttc cgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgatagtg accgtgctag tgccagagcg ttttcgcac 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240
 gtgcgcccgc cgcagagtg tattctaagc acaagtatca ttgtttctgt ccgatgagat 300
 gtcggtccg 309

<210> 25

<211> 246

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 25

atgggcggcg cgtgagagaa gcccagacca attacctacc caaagtggag aaagtccacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcgagcttc cgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgatagtg accgtgctag tgccagagcg ttttcgcac 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggac 240
 ggtccg 246

10 <210> 26

<211> 200

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 26

atgggcggcg cgtgagagaa gcccagacca attacctacc caaagtggag aaagtccacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcgagcttc cgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgatagtg accgtgctag tgccagagcg ttttcgcac 180
 tggcttcaaa actcgggtccg 200

<210> 27

<211> 524

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 27

```

atgggcgggc cgtgagagaa gccagacca attacctacc caaagtggag aaagttcacg      60
ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg      120
aggtagaagc caagcaggtc actgatagtg accgtgctag tgccagagcg ttttcgcatc      180
tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa      240
gtgcgcccgc ccgcagagtg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccggtgaggt      300
gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt gtgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg      360
aaataactga taaggaattg gacaagaaag tgaaggagct cgccgccgtc gtgagcgacc      420
ctgacctgga aactgagact gtgtgcctcc acgacgacga gtcgtgtcgc tacgaagggc      480
aagtcgctgt ttaccagggg gtatacgcgg ttgacggacc gacc                          524

```

<210> 28

<211> 507

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 28

ES 2 588 906 T3

atgggcgggcg cgtgagagaa gccagacca attacctacc caaagtggag aaagtccacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgatagtg accgtgctag tgccagagcg ttttcgcatc 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240
 gtgcgcccgc ccgcagagtg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccggtgaggt 300
 gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt gtgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg 360
 aaataactga taaggaattg gacaagaaag tgaaggagct cgccgccgtc gtgagcgacc 420
 ctgacctgga aactgagact gtgtgcctcc acgacgacga gtcgtgtcgc tacgaagggc 480
 aagtcgctgt ttcggtccga ggcgacc 507

<210> 29

<211> 453

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 29

atgggcgggcg cgtgagagaa gccagacca attacctacc caaagtggag aaagtccacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgatagtg accgtgctag tgccagagcg ttttcgcatc 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240
 gtgcgcccgc ccgcagagtg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccggtgaggt 300
 gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt gtgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg 360
 aaataactga taaggaattg gacaagaaag tgaaggagct cgccgccgtc gtgagcgacc 420
 ctgacctgga aactgagact gtgcggtccg acc 453

10 <210> 30

<211> 415

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

ES 2 588 906 T3

<400> 30

atgggcggcg cgtgagagaa gcccagacca attacctacc caaagtggag aaagttcacg	60
ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg	120
aggtagaagc caagcaggtc actgatagtg accgtgctag tgccagagcg ttttcgcatc	180
tggttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa	240
gtgcgcccgc ccgcagagtg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccggtgaggt	300
gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt gtgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg	360
aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgcggtc cgacc	415

<210> 31

<211> 354

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 31

atgggcggcg cgtgagagaa gcccagacca attacctacc caaagtggag aaagttcacg	60
ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg	120
aggtagaagc caagcaggtc actgatagtg accgtgctag tgccagagcg ttttcgcatc	180
10 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa	240
gtgcgcccgc ccgcagagtg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccggtgaggt	300
gtgcggaaga tccggacaga ttgtataata tgcaacctaa tctgcgggcc gacc	354

<210> 32

<211> 312

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 32

ES 2 588 906 T3

atgggcggcg cgtgagagaa gcccagacca attacctacc caaagtggag aaagtccacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgatagtg accgtgctag tgccagagcg ttttcgcac 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240
 gtgcgcccgc ccgcagagtg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat 300
 gtcggtccga cc 312

<210> 33

<211> 249

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 33

atgggcggcg cgtgagagaa gcccagacca attacctacc caaagtggag aaagtccacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgatagtg accgtgctag tgccagagcg ttttcgcac 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggac 240
 ggaccgacc 249

10 <210> 34

<211> 203

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 34

atgggcggcg cgtgagagaa gcccagacca attacctacc caaagtggag aaagtccacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgatagtg accgtgctag tgccagagcg ttttcgcac 180
 tggcttcaaa actcgggtccg acc 203

<210> 35

<211> 521

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 35

```

atgggcggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaataggag aaagttcacg      60
ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc cgcagtttg      120
aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc      180
tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa      240
gtgcgcccgc cgcagaaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat      300
gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg      360
aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgccgtc atgagcgacc      420
ctgacctgga aactgagact atgtgcctcc acgacgacga gtcgtgtcgc tacgaagggc      480
aagtcgctgt ttaccaggat gtatacgcgg ttgacggacc g                          521
    
```

<210> 36

<211> 499

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 36

ES 2 588 906 T3

atagggcgcg catgagagaa gcccagacca attacctacc caaataggag aaagttcacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240
 gtgcgcccgc ccgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat 300
 gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg 360
 aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgccgtc atgagcgacc 420
 ctgacctgga aactgagact atgtgcctcc acgacgacga gtcgtgtcgc tacgaagggc 480
 aagtcgctgt ttcggtccg 499

<210> 37

<211> 450

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 37

atagggcgcg catgagagaa gcccagacca attacctacc caaataggag aaagttcacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240
 gtgcgcccgc ccgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat 300
 gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg 360
 aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgccgtc atgagcgacc 420
 ctgacctgga aactgagact atgcggtccg 450

10 <210> 38

<211> 412

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 38

atagggcggcg catgagagaa gcccagacca attacctacc caaataggag aaagttcacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcgagagcttc cgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240
 gtgcgcccgc cgcagaaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat 300
 gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg 360
 aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgcggtc cg 412

<210> 39

<211> 351

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 39

10 atagggcggcg catgagagaa gcccagacca attacctacc caaataggag aaagttcacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcgagagcttc cgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240
 gtgcgcccgc cgcagaaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat 300
 gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgcgggtcc g 351

<210> 40

<211> 309

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 40

ES 2 588 906 T3

atagcgggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaataggag aaagtccacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcac 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg accatccga cacgatcctt gacattggaa 240
 gtgcgcccgc ccgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat 300
 gtcggaccg 309

<210> 41

<211> 248

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 41

atagcgggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaataggag aaagtccacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcac 180
 tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg accatccga cacgatcctt gacattggac 240
 ggtccgcg 248

10 <210> 42

<211> 200

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 42

atagcgggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaataggag aaagtccacg 60
 ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gggagcttc ccgcagtttg 120
 aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcac 180
 tggcttcaaa actcgggccg 200

<210> 43

<211> 524

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 43

```

atgggcggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaataggag aaagttcacg      60
ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg      120
aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc      180
tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa      240
gtgcgcccgc ccgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat      300
gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg      360
aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgccgtc atgagcgacc      420
ctgacctgga aactgagact atgtgcctcc acgacgacga gtcgtgtcgc tacgaagggc      480
aagtcgctgt ttaccaggat gtatacgcgg ttgacggacc gacc                          524

```

<210> 44

<211> 502

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 44

```

ataggcggcg catgagagaa gccagacca attacctacc caaataggag aaagttcacg      60
ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg      120
aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc      180
tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa      240
gtgcgcccgc ccgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat      300
gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg      360
aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgccgtc atgagcgacc      420
ctgacctgga aactgagact atgtgcctcc acgacgacga gtcgtgtcgc tacgaagggc      480

```

15

aagtcgctgt ttcggtccga cc 502

<210> 45

<211> 453

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 45

atagggcggcg catgagagaa gcccagacca attacctacc caaataggag aaagttcacg 60

ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcgagcttc cgcagtttg 120

aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcac 180

tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240

gtgcgcccgc cgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat 300

gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg 360

aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgcccgc atgagcgacc 420

ctgacctgga aactgagact atgcggtccg acc 453

10 <210> 46

<211> 415

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 46

atagggcggcg catgagagaa gcccagacca attacctacc caaataggag aaagttcacg 60

ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcgagcttc cgcagtttg 120

aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcac 180

tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtgg acccatccga cacgatcctt gacattggaa 240

gtgcgcccgc cgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat 300

gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg 360

aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgcccgc cgacc 415

<210> 47

<211> 354

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 47

atagggcggcg	catgagagaa	gcccagacca	attacctacc	caaataggag	aaagttcacg	60
ttgacatcga	ggaagacagc	ccattcctca	gagctttgca	gcggagcttc	ccgcagtttg	120
aggtagaagc	caagcaggtc	actgataatg	accatgctaa	tgccagagcg	ttttcgcatac	180
tggcttcaaa	actgatcgaa	acggagggtgg	acccatccga	cacgatcctt	gacattggaa	240
gtgcgcccgc	ccgcagaatg	tattctaagc	acaagtatca	ttgtatctgt	ccgatgagat	300
gtgcggaaga	tccggacaga	ttgtataagt	atgcaactaa	gctgcggacc	gacc	354

<210> 48

10 <211> 312

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

15 <400> 48

atagggcggcg	catgagagaa	gcccagacca	attacctacc	caaataggag	aaagttcacg	60
ttgacatcga	ggaagacagc	ccattcctca	gagctttgca	gcggagcttc	ccgcagtttg	120
aggtagaagc	caagcaggtc	actgataatg	accatgctaa	tgccagagcg	ttttcgcatac	180
tggcttcaaa	actgatcgaa	acggagggtgg	acccatccga	cacgatcctt	gacattggaa	240
gtgcgcccgc	ccgcagaatg	tattctaagc	acaagtatca	ttgtatctgt	ccgatgagat	300
gtcggaccga	cc					312

<210> 49

<211> 249

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 49

ataggcggcg	catgagagaa	gcccagacca	attacctacc	caaataggag	aaagttcacg	60
ttgacatcga	ggaagacagc	ccattcctca	gagctttgca	gcggagcttc	ccgcagtttg	120
aggtagaagc	caagcaggtc	actgataatg	accatgctaa	tgccagagcg	ttttcgcatac	180
tggcttcaaa	actgatcgaa	acggagggtg	acccatccga	cacgatcctt	gacattggac	240
ggtccgacc						249

5 <210> 50

<211> 203

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 50

ataggcggcg	catgagagaa	gcccagacca	attacctacc	caaataggag	aaagttcacg	60
ttgacatcga	ggaagacagc	ccattcctca	gagctttgca	gcggagcttc	ccgcagtttg	120
aggtagaagc	caagcaggtc	actgataatg	accatgctaa	tgccagagcg	ttttcgcatac	180
tggcttcaaa	actcgggtccg	acc				203

<210> 51

<211> 166

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 51

ataggcggcg	catgagagaa	gcccagacca	attaccgata	tcgaagccaa	gcaggtcact	60
gataatgacc	atgctaattgc	cagagcgttt	tcgcatctgg	cttcaaaaact	gatcgaaacg	120
gaggtggacc	catccgacac	gatccttgac	attggacgga	ccgacc		166

<210> 52

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 52

atthgtttt taatattc 19

<210> 53

<211> 752

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 53

atgggcgggc catgagagaa gcccagacca attacctacc caaaatggag aaagtccacg 60

ttgacatcga ggaagacagc ccattcctca gagctttgca gcggagcttc ccgcagtttg 120

aggtagaagc caagcaggtc actgataatg accatgctaa tgccagagcg ttttcgcatc 180

tggcttcaaa actgatcgaa acggaggtag acccatccga cacgacctt gacattggaa 240

15 gtgcgcccgc ccgcagaatg tattctaagc acaagtatca ttgtatctgt ccgatgagat 300

gtgcggaaga tccggacaga ttgtataagt atgcaactaa gctgaagaaa aactgtaagg 360

aaataactga taaggaattg gacaagaaaa tgaaggagct cgccgcccgc atgagcgacc 420

ctgacctgga aactgagact atgtgcctcc acgacgacga gtcgtgtcgc tacgaagggc 480

aagtcgctgt ttaccaggat gtatacgcgg ttgacggacc gatgcagatc ttcgtgaaga 540

ccctgaccgg caagaccatc accttgaggg tggagcccag tgacaccatc gagaatgtga 600

aggccaagat ccaggataaa gagggcatcc ccctgacca gcagaggctg atctttgccg 660

gcaagcagct agaagatggc cgcactctct ctgattacaa catccagaaa gagtcgaccc 720

tgcacctggg cctccgtctg aggggcccgc cg 752

<210> 54

<211> 755

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 54

ataggcggcg	catgagagaa	gcccagacca	attacctacc	caaaatggag	aaagttcacg	60
ttgacatcga	ggaagacagc	ccattcctca	gagctttgca	gcgagcttc	ccgcagtttg	120
aggtagaagc	caagcaggtc	actgataatg	accatgctaa	tgccagagcg	ttttcgcac	180
tggcttcaaa	actgatcgaa	acggagggtg	acccatccga	cacgatcctt	gacattggaa	240
gtgcgcccgc	ccgcagaatg	tattctaagc	acaagtatca	ttgtatctgt	ccgatgagat	300
gtgcggaaga	tccggacaga	ttgtataagt	atgcaactaa	gctgaagaaa	aactgtaagg	360
aaataactga	taaggaattg	gacaagaaaa	tgaaggagct	cgccgccgtc	atgagcgacc	420
ctgacctgga	aactgagact	atgtgcctcc	acgacgacga	gtcgtgtcgc	tacgaagggc	480
aagtcgctgt	ttaccaggat	gtatacgcg	ttgacggacc	gatgcagatc	ttcgtgaaga	540
ccctgaccgg	caagaccatc	accttgagg	tggagcccag	tgacaccatc	gagaatgtga	600
aggccaagat	ccaggataaa	gagggcatcc	ccctgacca	gcagaggctg	atctttgccg	660
gcaagcagct	agaagatggc	cgcactctct	ctgattacaa	catccagaaa	gagtcgacc	720
5 tgcacctggt	cctccgtctg	aggggaggac	cgacc			755

<210> 55

<211> 374

<212> ADN

<213> Virus de la encefalitis equina venezolana

10 <400> 55

tggtcactag	tgaccacat	gtgtctgctc	gccaatgtga	cgttcccatg	tgctcaacca	60
ccaatttgct	acgacagaaa	accagcagag	actttggcca	tgctcagcgt	taacatccct	120
gctgggagga	tcagccgtaa	ttattataat	tggcttggtg	ctggctacta	ttgtggccat	180
gtacgtgctg	accaaccaga	aacataattg	aatacagcag	caattggcaa	gctgcttaca	240
tagaactcgc	ggcgattggc	atgccgcttt	aaaatTTTTA	TTTTATTTT	CTTTCTTTT	300
ccgaatcgga	TTTTGTTTT	AATATTTCAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	360
AAAAAAAAAA	AAAA					374

<210> 56

<211> 166

<212> ADN

<213> Virus de la encefalitis equina venezolana

5 <400> 56

tgaatacagc agcaattggc aagctgctta catagaactc gcggcgattg gcatgccgct 60

ttaaaatttt tattttattt ttcttttctt ttccgaatcg gattttgttt ttaatatttc 120

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 166

<210> 57

<211> 115

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 57

taagcatgcc gctttaaaat ttttatttta tttttctttt cttttccgaa tcggattttg 60

tttttaatat ttcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 115

15 <210> 58

<211> 49

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

<400> 58

taagcatgca tttgtttt aatattcaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 49

<210> 59

<211> 118

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de reconocimiento sintética no codificante

ES 2 588 906 T3

<400> 59

taagcatgcc gctttaa^{aa}t ttttatttta tttttctttt cttttccgaa t^{cg}gattttg 60

tttttaatat ttcaaaaaa^a aaaaaaaa^a aaaaaaaa^a aaaaaaaa^a aaaaaaaa^a 118

<210> 60

<211> 34

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido

<400> 60

10 cctcgaccg accatgtcac tagtgaccac catg 34

<210> 61

<211> 73

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Cebador oligonucleótido

<400> 61

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttgaaat attaaaaaca 60

aaatccgatt cgg 73

<210> 62

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido

25 <400> 62

accgtaccc tggatgctgt 20

<210> 63

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido

<400> 63

5 cctcggaccg aaacagcgac ttgcccttcg tagcgacac 39

<210> 64

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Cebador oligonucleótido

<400> 64

cctcggaccg catagtctca gttccaggt cagggtcgc 39

<210> 65

15 <211> 43

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido

20 <400> 65

cctcggaccg cggcgagctc cttcatttc ttgtccaatt cct 43

<210> 66

<211> 44

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido

<400> 66

cctcggaccg cagcttagtt gcatacttat acaatctgtc cgga 44

30 <210> 67

<211> 45

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido
 5 <400> 67
 cctcggaccg acatctcatc ggacagatac aatgatactt gtgct 45
 <210> 68
 <211> 39
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido
 <400> 68
 cctcggaccg tccaatgtca aggatcgtgt cggatgggt 39
 15 <210> 69
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Cebador oligonucleótido
 <400> 69
 cctcggaccg agttttgaag ccagatgcga aaacgctctg 40
 <210> 70
 <211> 39
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido
 <400> 70
 30 cctcggaccg cttggcttct acctcaaact gcgggaagc 39
 <210> 71

<211> 40

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Cebador oligonucleótido

<400> 71

gaccaattac ctacccaaat aggagaaagt tcacgttgac 40

<210> 72

<211> 40

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido

<400> 72

15 gtcaacgtga actttctcct atttggttag gtaattggtc 40

<210> 73

<211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Cebador oligonucleótido

<400> 73

ataggcggcg cgtgagagaa gcccag 26

<210> 74

25 <211> 34

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido

30 <400> 74

cctaccctaaa gtggagaaag ttcacgttga catc 34

<210> 75
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial
5 <220>
<223> Cebador oligonucleótido
<400> 75
caggctactg atagtgaccg tgctagtgcc agagcg 36
<210> 76
10 <211> 28
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador oligonucleótido
15 <400> 76
gcccgccgc agagtgtatt ctaagcac 28
<210> 77
<211> 32
<212> ADN
20 <213> Artificial
<220>
<223> Cebador oligonucleótido
<400> 77
gtatctgtcc ggtgaggtgt gcggaagatc cg 32
25 <210> 78
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
30 <223> Cebador oligonucleótido
<400> 78

gacagattgt ataagtgtc aactaagctg 30
 <210> 79
 <211> 26
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido
 <400> 79
 gaatggacaa gaaagtgaag gagctc 26
 10 <210> 80
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Cebador oligonucleótido
 <400> 80
 ccgtcgtgag cgaccctgac ctggaaac 28
 <210> 81
 <211> 25
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido
 <400> 81
 25 gaaactgaga ctgtgctc ccacg 25
 <210> 82
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido

<400> 82
 gtttaccagg gtgtatacgc ggttg 25
 <210> 83
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido
 <400> 83
 10 tcagtgaac gaaaactcac g 21
 <210> 84
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido
 <400> 84
 ttgatatcg gtaattggtc tgggcttctc 30
 <210> 85
 20 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido
 25 <400> 85
 ttgatatcg aagccaagca ggtcactg 28
 <210> 86
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>

<223> Cebador oligonucleótido
<400> 86
gcaacgcggg gaggcagaca 20
<210> 87
5 <211> 26
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador oligonucleótido
10 <400> 87
gcatgctcaa ttatgttct ggttgg 26
<210> 88
<211> 20
<212> ADN
15 <213> Artificial
<220>
<223> Cebador oligonucleótido
<400> 88
cgacatagtc tagtccgcca 20
20 <210> 89
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
25 <223> Cebador oligonucleótido
<400> 89
gcatgcattt tgttttaaat attcaaa 28
<210> 90
<211> 21
30 <212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido

<400> 90

gctcacatgt tcttctctgc g 21

5 <210> 91

<211> 34

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Cebador oligonucleótido

<400> 91

cctcggaccg accatgttcc cgttccagcc aatg 34

<210> 92

<211> 31

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido

<400> 92

20 acatgcatgc ttattgctcg cagttctccg g 31

<210> 93

<211> 34

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Cebador oligonucleótido

<400> 93

acatgcatgc ttaccattgc tcgcagttct ccgg 34

<210> 94

30 <211> 31

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido

<400> 94

5 cctcgggccg accatgctag tgaccacat g 31

<210> 95

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Cebador oligonucleótido

<400> 95

acatacacgg tagtcacaat 20

<210> 96

15 <211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido

20 <400> 96

catcgacgga ccgatgcaga tcttcgtgaa gaccc 35

<210> 97

<211> 34

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido

<400> 97

gatttcggg cgcgccctca gacggaggac cagg 34

30 <210> 98

<211> 31

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleótido

5 <400> 98

cctcggaccg atgtcccgt tccagccaat g 31

Reivindicaciones

1. Una molécula de ARN aislada que comprende:
 - a) una secuencia de reconocimiento de replicación 5' de alfavirus, en donde al menos un codón de iniciación ha sido removido de la secuencia de reconocimiento de replicación 5';
 - 5 b) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína estructural de alfavirus; y
 - c) una secuencia de reconocimiento de replicación 3' de alfavirus,

con la condición de que la molécula de ARN no contenga un promotor que dirige la transcripción de la secuencia de nucleótidos de (b), y en donde las secuencias de reconocimiento de replicación 5' y 3' de (a) y (c) dirigen la replicación directa de toda la molécula de ARN en presencia de proteínas no estructurales de alfavirus.
- 10 2. La molécula de ARN de la reivindicación 1, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína estructural de alfavirus se selecciona del grupo que consiste de una secuencia de nucleótidos que codifica 1) una proteína de la cápside del alfavirus, 2) proteínas E1 y E2 del alfavirus en cualquier orden, 3) proteína de la cápside del alfavirus y proteína E1 del alfavirus en cualquier orden, 5) proteína de la cápside del alfavirus y proteína E2 del alfavirus en cualquier orden, 6) proteína E2 del alfavirus, y 7) proteína E1 del alfavirus.
- 15 3. La molécula de ARN de la reivindicación 1 o 2, en donde la secuencia de reconocimiento de replicación 5' de alfavirus es la secuencia de reconocimiento de replicación 5' del virus de la encefalitis equina venezolana y opcionalmente en donde la secuencia de reconocimiento de replicación 5' está entre 70 y 524 nucleótidos de longitud.
- 20 4. La molécula de ARN de cualquier reivindicación precedente, en donde la secuencia de reconocimiento de replicación 3' de alfavirus es la secuencia de reconocimiento de replicación 3' del virus de la encefalitis equina venezolana y opcionalmente donde la secuencia de reconocimiento de replicación 3' es de 19 a 325 nucleótidos de longitud.
5. La molécula de ARN de cualquier reivindicación precedente en donde al menos un codón de iniciación es el codón de iniciación para una proteína no estructural 1 (nsp1).
6. La molécula de ARN de cualquier reivindicación precedente, en donde todos los codones de iniciación han sido removidos de la secuencia de reconocimiento de replicación 5'.
- 25 7. La molécula de ARN de cualquier reivindicación precedente, en donde el ARN está protegido en el terminal 5'
8. Un método de elaboración de una partícula de replicón de alfavirus, que comprende la introducción una o más de las moléculas de ARN de cualquier reivindicación anterior en una célula, por lo que la combinación de moléculas de ARN codifica todas las proteínas estructurales de alfavirus necesarias para la producción de una partícula de replicón de alfavirus, junto con un ARN del replicón de alfavirus, bajo condiciones mediante las cuales se producen partículas de replicón de alfavirus.
- 30 9. El método de la reivindicación 8, en donde se introducen dos moléculas de ARN en la célula, en donde una primera molécula de ARN de las dos moléculas de ARN codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus y una segunda molécula de ARN de las dos moléculas de ARN codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus, al menos una de las cuales es diferente de la proteínas estructurales del alfavirus codificadas por la primera molécula de ARN y opcionalmente una tercera molécula de ARN codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus, al menos una de las cuales es diferente de las proteínas estructurales de alfavirus codificadas por la primera molécula de ARN y la segunda molécula de ARN.
- 35 10. El método de la reivindicación 8, en donde una o más de las moléculas de ARN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, son introducidas en la célula junto con uno o más constructos auxiliares de alfavirus asistidos por promotor, por lo que la combinación de moléculas de ARN y los constructos auxiliares de alfavirus asistidos por promotor codifica todas las proteínas estructurales de alfavirus necesarias para la producción de una partícula de replicón de alfavirus.
- 40 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 8, 9 o 10, en donde al menos una de las una o más moléculas de ARN está protegida en el terminal 5'.
- 45 12. Una población de partículas de replicón del alfavirus, que comprende un subconjunto de partículas que comprenden la molécula de ARN de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la población contiene partículas no detectables del virus alfavirus con capacidad de replicación por 10^8 partículas de replicones de alfavirus,

según se determina mediante el paso en células permisivas en cultivo.

13. La población de la reivindicación 12, en donde las partículas de replicón del alfavirus comprenden una o más mutaciones atenuantes ya sea en una proteína estructural del alfavirus o una proteína no estructural del alfavirus o tanto una proteína estructural del alfavirus como una proteína no estructural del alfavirus.

5 14. Una composición que comprende la población de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. Un vector o constructo de ácido nucleico o célula que comprende la molécula de ARN de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

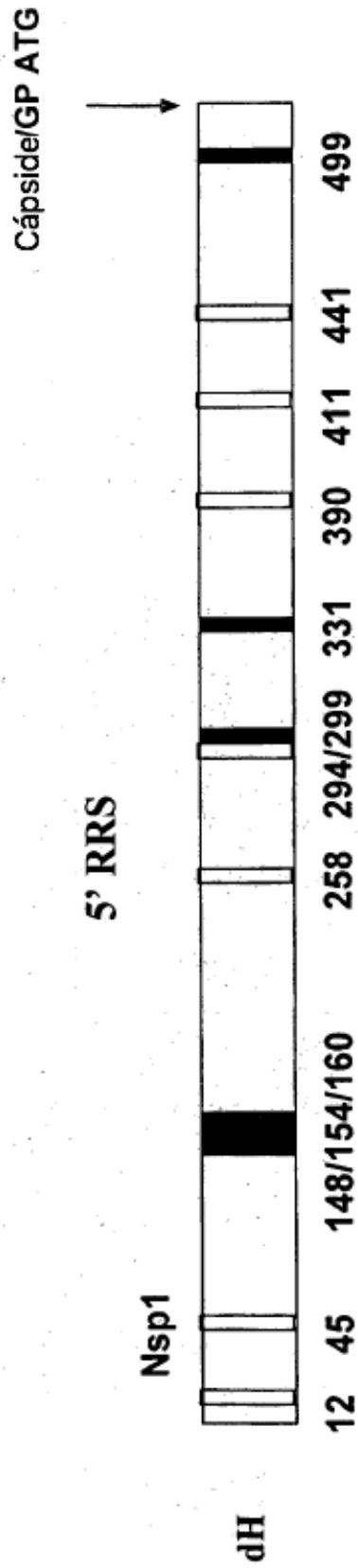


Figura 1

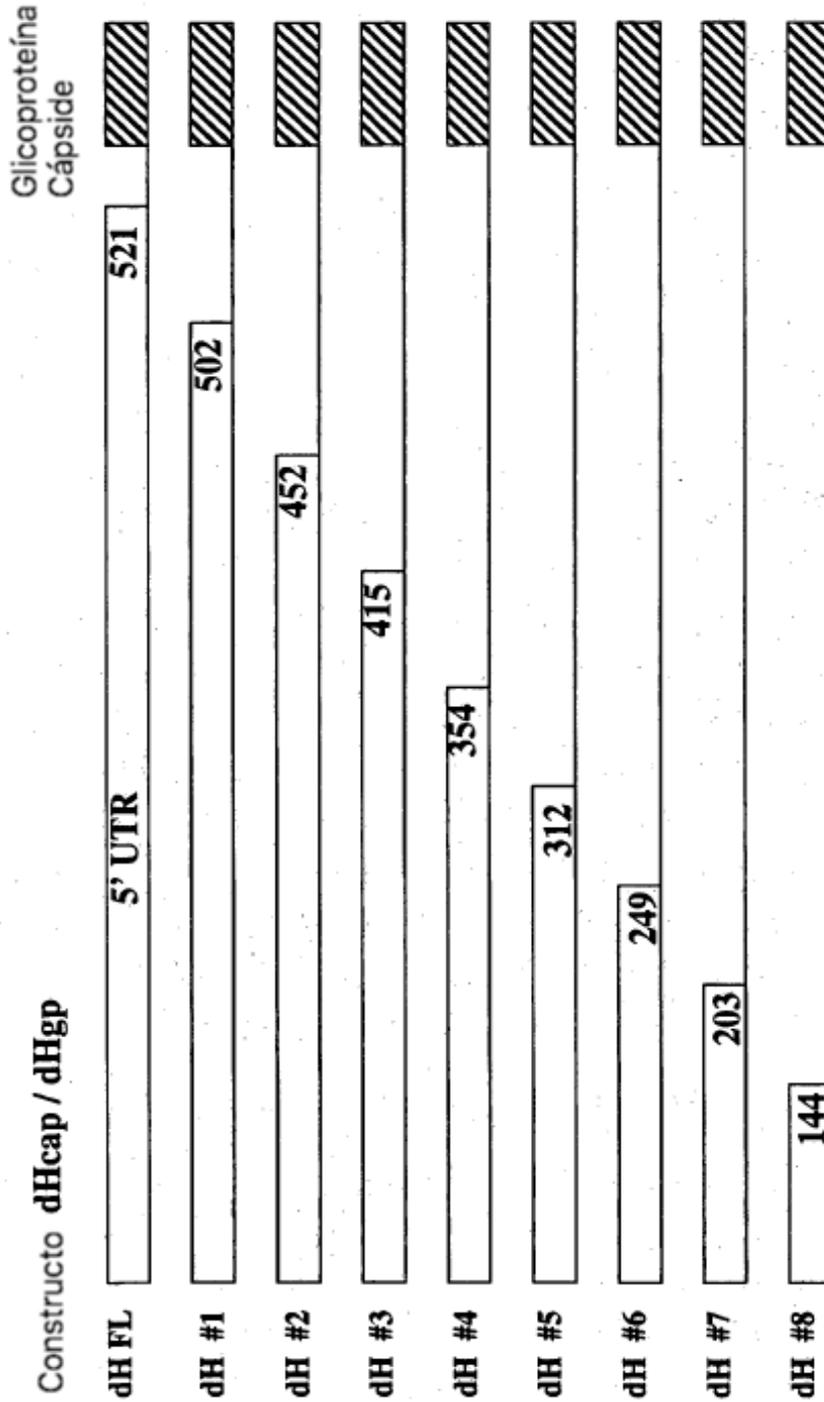


Figura 2

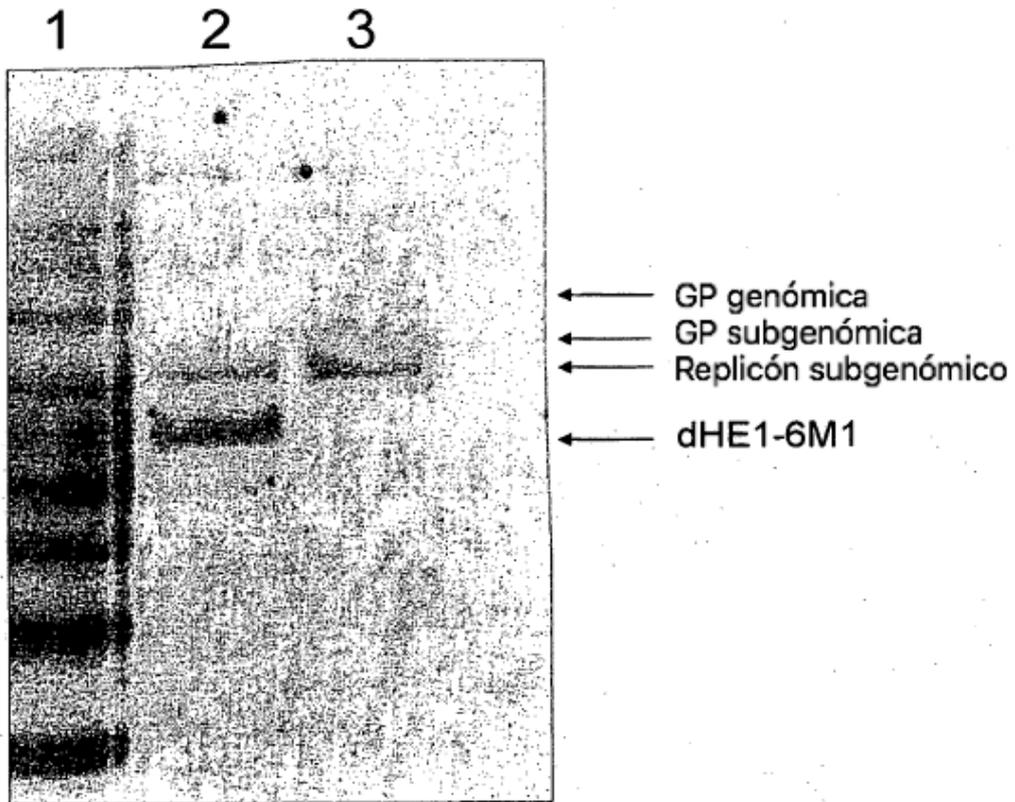


Figura 3

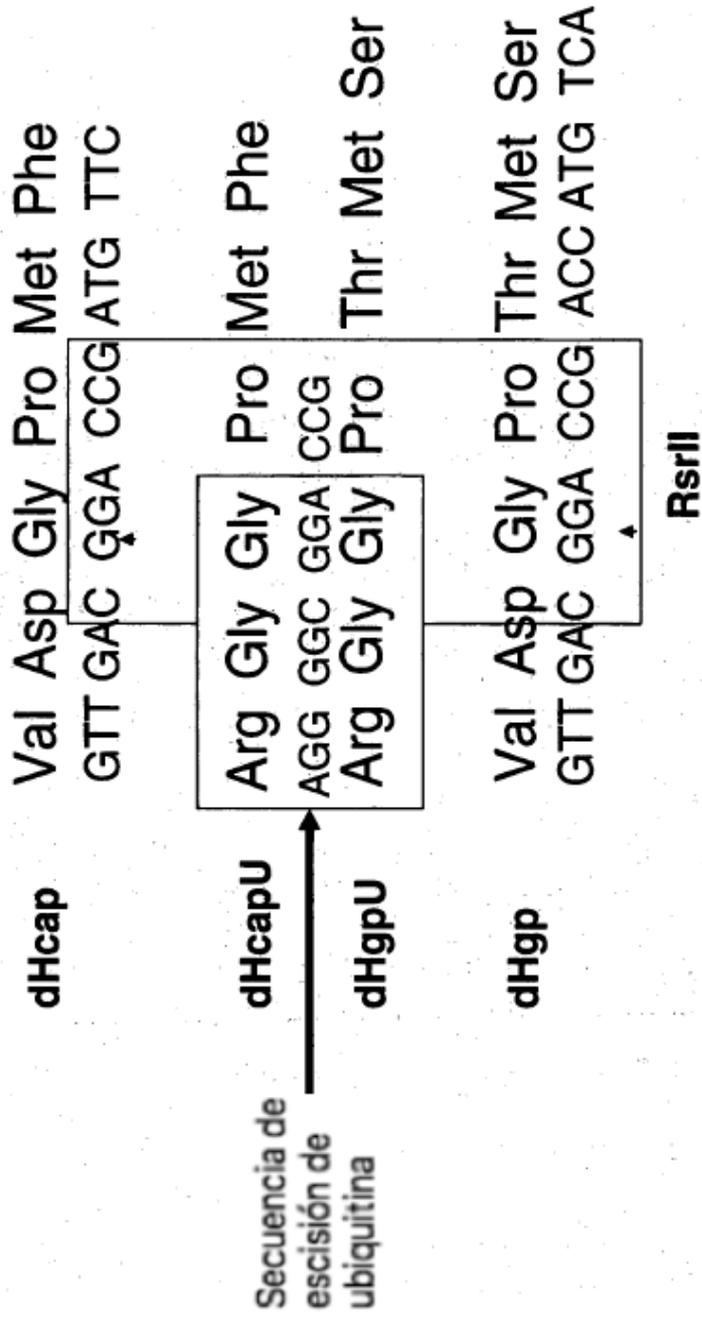


Figura 4

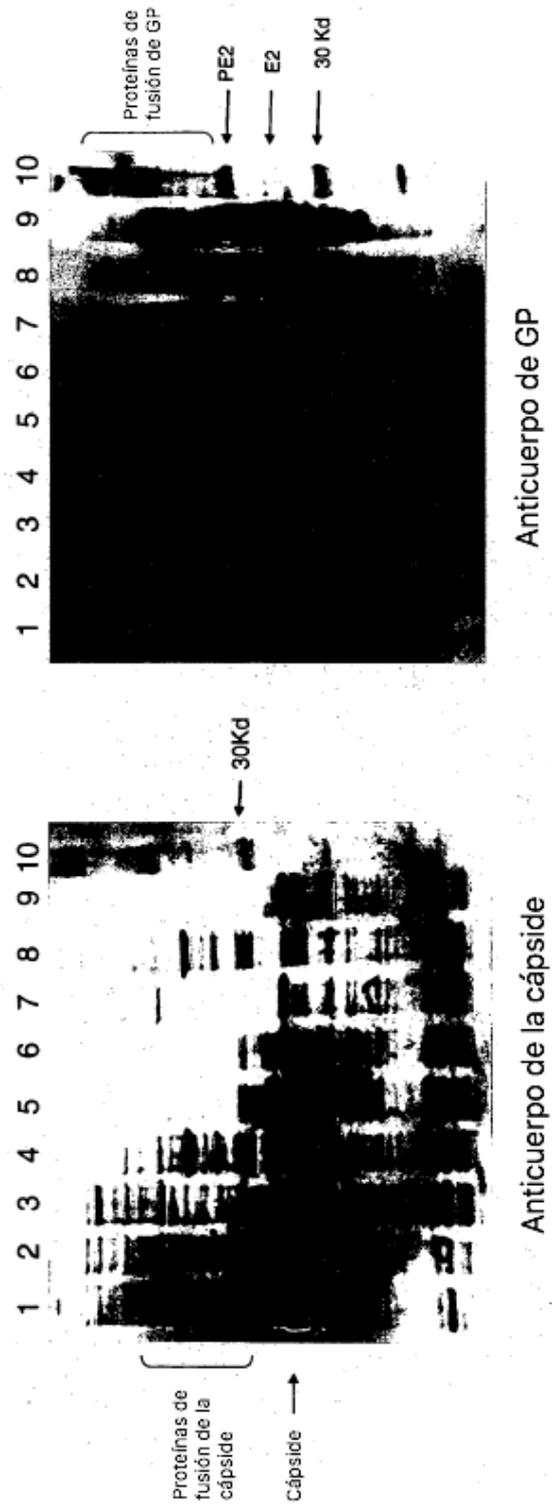
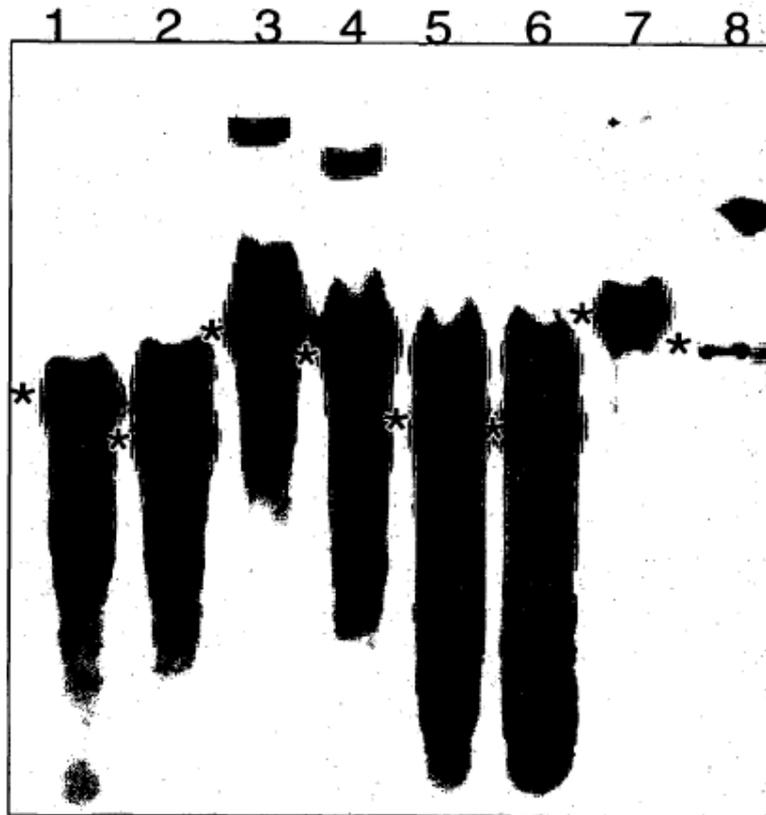
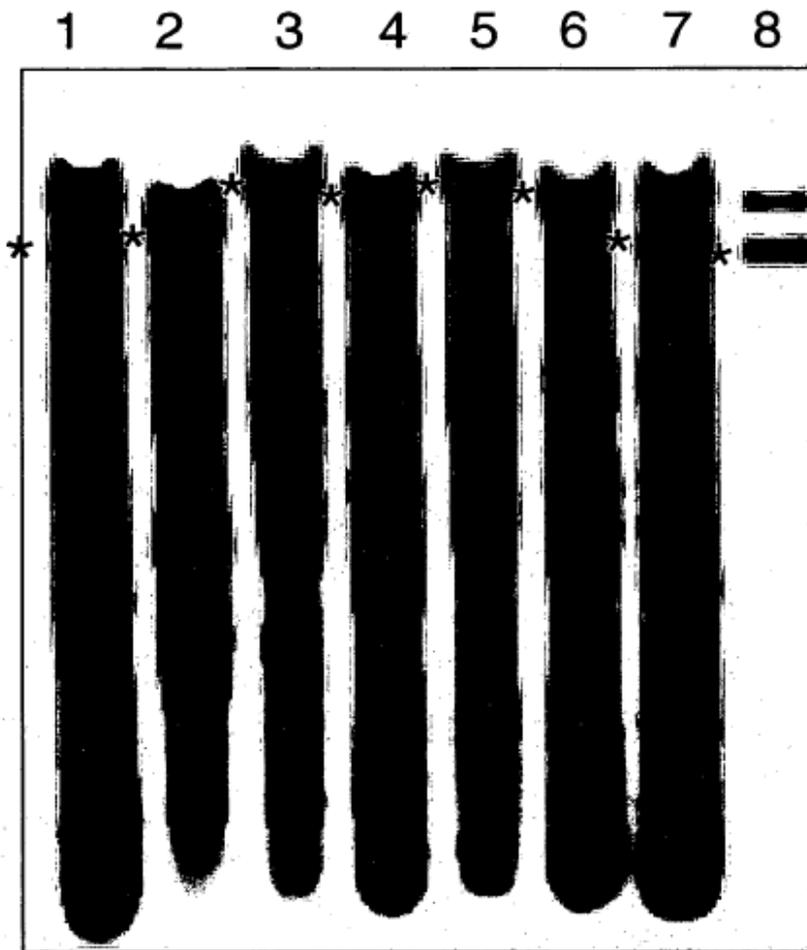


Figura 5



sonda de cápside

Figura 6



sonda de GP

Figura 7