

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 309**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00	(2006.01)
C12N 15/63	(2006.01)
C12N 5/07	(2010.01)
C12N 5/10	(2006.01)
C12N 15/86	(2006.01)
C07H 21/02	(2006.01)
A01N 63/00	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2003 PCT/US2003/039723**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2004 WO04055166**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2003 E 03813432 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 1585812**

54 Título: **Partículas de replicón de alfavirus multi-antigénico y métodos**

30 Prioridad:

13.12.2002 US 433058 P
13.12.2002 US 433299 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SMITH, JONATHAN, F.;
KAMRUD, KURT;
DRYGA, SERGEY y
CALEY, IAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

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

ES 2 618 309 T3

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

DESCRIPCIÓN

Partículas de replicón de alfavirus multi-antigénico y métodos

Antecedentes de la invención

5 La presente descripción se refiere a tecnología de ADN recombinante, y en particular a introducir ácido(s) nucleico(s) extraño(s) en una célula eucariótica hospedante, y más particularmente a producir partículas de tipo vírico infecciosas con defecto de propagación que colectivamente dirigen la expresión de un conjunto representativo de proteínas inmunogénicas (una biblioteca de expresión) de un patógeno (virus, hongo, bacteria o protozoo), parásito o célula tumoral. Dichas bibliotecas presentan aplicaciones en medicina humana y veterinaria.

10 Una vacuna es una de las estrategias más eficaces, seguras y económicas para prevenir enfermedades y controlar la propagación de enfermedades. Las vacunas convencionales son una forma de inmunoprofilaxis administrada antes de la aparición de la enfermedad para proporcionar una inmunoprotección a través de la generación de una fuerte memoria inmunológica en el hospedante contra un antígeno específico. El objetivo primordial de la vacunación es activar la respuesta inmune específica, principalmente para generar linfocitos B y T contra antígeno(s) específico(s) asociado(s) a la enfermedad o al agente de enfermedad.

15 De forma similar, las vacunas contra el cáncer están dirigidas a generar respuestas inmunes contra antígenos asociados a tumores cancerosos. Los cánceres pueden ser inmunogénicos y pueden activar respuestas inmunes del hospedante capaces de controlar la enfermedad y producir una regresión tumoral. Sin embargo, al mismo tiempo el cáncer puede ser inmunosupresor de forma específica o no específica y puede evadir el sistema inmune del hospedante. Se han identificado numerosos antígenos de proteína/glicoproteína asociados a tumor y se han ligado a
20 determinados tipos de cáncer. Her-2-neu, PSA, PSMA, MAGE-3, MAGE-1, gp100, TRP-2, tirosinasa, MART-1, β -HCG, CEA, Ras; B-catenina, gp43, GAGE-1, BAGE-1, MUC-1,2,3 y HSP-70 son solo unos pocos ejemplos.

Se han aplicado múltiples estrategias para inmunizar pacientes de cáncer con antígenos asociados a tumor (TAAs, del inglés "tumor-associated antigens"). Las vacunas en uso clínico entran dentro de diversas categorías determinadas por sus componentes, que varían entre células enteras y péptidos inmunogénicos. Las vacunas de
25 célula entera y de lisato celular pueden ser vacunas autólogas o alogénicas, dependiendo del origen del hospedante de las células cancerosas. Una vacuna contra el cáncer de célula entera es una formulación específica del paciente preparada a partir del propio tumor del paciente. Hasta la fecha, muchas vacunas de cáncer autólogas no han tenido éxito clínico a menos que sean modificadas para aumentar su inmunogenicidad intrínseca, por ejemplo mediante la co-expresión de linfoquinas tales como GM-CSF (Ward et al., 2002, Cancer Immunol. Immunother. 51: 351-7).
30 Puesto que son específicas del paciente, también pueden ser costosas y limitadas a los pacientes de los que se pueden obtener células cancerosas en cantidad suficiente para producir una suspensión de células individuales. Adicionalmente, el número inherentemente limitado de células es problemático con respecto a la necesidad de modificación o de vacunaciones múltiples, haciendo que la formulación autóloga no sea práctica para la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad temprana. Algunos de estos problemas se resuelven con vacunas de célula entera alogénicas o con vacunas de célula entera modificadas genéticamente, en las que en lugar de suministrar agentes inmunoestimulantes tales como linfoquinas de forma exógena con la vacuna tumoral, las células tumorales son modificadas genéticamente para expresar la linfoquina endógenamente. Sin embargo, estos métodos pueden requerir mucho tiempo y ser prohibitivamente caros de producir.

Las vacunas de antígeno de proteínas de cáncer naturales y recombinantes son vacunas subunidad. Al contrario
40 que las vacunas de célula entera, estas vacunas de subunidad contienen antígenos inmunogénicos definidos a niveles estandarizados. El problema principal de dichas vacunas es encontrar el adyuvante y el sistema de administración adecuados. Además, la purificación de antígenos tumorales naturales o recombinantes es tediosa y no siempre es logísticamente práctica. Las vacunas de cáncer de proteínas requieren cultivar células tumorales, purificar antígenos tumorales, o producir péptidos específicos o proteínas recombinantes. Adicionalmente, las
45 vacunas que se preparan exclusivamente a partir de proteínas/péptidos tumorales presentan problemas intrínsecos, ya que pueden estar limitadas en capacidad para ser dirigidas a los mecanismos de presentación a antígeno correctos, o pueden no ser reconocidas por el hospedante debido a polimorfismos de complejo de histocompatibilidad mayor (MHC, del inglés "major histocompatibility complex") del hospedante. Por estas razones, es previsible que las vacunas tumorales de célula entera, o administradas mediante vector, que expresan una gran
50 variedad de antígenos tumorales, constituyan los métodos de vacunación preferidos. Las vacunas que incluyen un ácido nucleico que codifica los antígenos tumorales, más que las vacunas que comprenden al propio antígeno, abordan algunos de dichos problemas. Hasta la fecha, estas estrategias han sido las más prometedoras en los ensayos pre-clínicos y clínicos. Entre las tecnologías actuales que se están aplicando a la vacunación contra el cáncer, dos sistemas en particular han demostrado un potencial significativo para su aplicación en este campo. El
55 primero es la administración de TAAs usando vectores virales, que incluyen aunque sin limitación, adenovíricos, de virus adenoasociado, retrovirales, de virus de la gripe, de flavivirus, de picornavirus, de virus del herpes y de alfavirus (véase la patente WO 99/51263). El segundo es la vacunación con proteínas o ARN de células tumorales usando células dendríticas derivadas *ex vivo* como vehículo de administración para la transferencia y la expresión de los TAAs en el hospedante (Heiser et al., 2002. J. Clin. Inv. 109: 409-417 y Kumamoto et al., 2002. Nature Biotech.
60 20: 64-69).

Un factor limitante en muchas estrategias de vacunas tumorales parece ser la disponibilidad limitada de antígenos específicos de tumor conocidos. Dichos antígenos específicos de tumor pueden variar no solo entre tipos de tejido del cual se originó el tumor, sino que pueden variar incluso de célula a célula dentro del mismo tumor. Un problema frustrante asociado al uso de tan solo un número limitado de dianas de antígeno tumoral en una vacuna es el potencial de “fuga del tumor” en donde el tumor básicamente evade la detección de las células inmunes efectoras inducidas por la vacuna por la eliminación de determinados antígenos asociados a tumor.

Esta observación llevó a los investigadores a diseñar vacunas contra el cáncer que expresen antígenos múltiples para reducir la propensión a la fuga del tumor. Desafortunadamente, debido al número limitado de antígenos que han sido identificados hasta la fecha, ésta no es una estrategia viable en la mayoría de los tumores. Por tanto, una evolución más reciente de la terapia contra el cáncer ha sido el uso de bibliotecas completas de antígenos tumorales. Esto combina las múltiples características beneficiosas que uno desearía en una vacuna contra el cáncer. Una vacuna que codifica un repertorio de antígenos tumorales completo evita la necesidad de identificación y aislamiento de antígenos; esencialmente se permite que el sistema inmune del receptor de la vacuna realice su selección a la hora de determinar a qué TAAs responderá el individuo. La segunda ventaja distintiva de esta estrategia es que, puesto que el repertorio de antígenos que está siendo expresado es tan amplio, la probabilidad de fuga del tumor se minimiza o elimina por completo. Actualmente esta estrategia se está investigando muy activamente con células dendríticas para administrar bibliotecas de antígenos tumorales. Estas células, que actúan como células presentadoras de antígeno presentando los antígenos tumorales al sistema inmune, son aisladas de cada paciente de cáncer, son cultivadas y expandidas *in vitro*, cargadas con antígeno tumoral en forma de proteína o de ácido nucleico; véanse las Patentes de EE.UU. n° 5.853.719 y 6.306.388. Esta estrategia ha generado datos clínicos prometedores en ensayos con humanos, y ha demostrado la capacidad para retardar el crecimiento tumoral en algunos individuos, e incluso para producir una regresión tumoral en una serie de pacientes (Sadanaga et al., 2001, Clin. Cancer Res. 7: 2277-84). La principal desventaja de esta tecnología es la necesidad de cultivo *in vitro*, expansión y carga de antígenos de las células dendríticas derivadas del paciente antes de la vacunación de cada individuo. Se trata de un proceso tedioso y caro, y puede ser altamente variable, ya que la población de células dendríticas puede variar enormemente de individuo a individuo en términos de fenotipo, características de crecimiento y actividad.

Hasta la fecha se ha estudiado ADN desnudo, ARN, vectores víricos y bacterianos para determinar su capacidad de inducir respuestas específicas de cáncer contra una biblioteca de antígenos tumoral. Una estrategia alternativa es el uso de vectores víricos para administrar una biblioteca de antígenos tumorales a un paciente con cáncer. Hasta la fecha, se ha logrado algún éxito con bibliotecas de expresión de ácido nucleico desnudo; p.ej., véanse las Patentes de EE.UU. n° 5.989.553 y 5.703.057. Los intentos de aumentar las respuestas inmunes producidas por vectores de ácido nucleico crudo incluyen el uso de vectores víricos auto-replicantes administrados en forma de ADN o ARN desnudo (Ying et al., 1999, Nature Medicine, 5:823-827).

Los vectores víricos han mostrado un gran potencial en ensayos preclínicos y clínicos para la prevención de una serie de dianas de enfermedades infecciosas. Uno de los temas más apremiantes para el desarrollo de vectores víricos para usos de vacuna profiláctica y terapéutica en humanos es la capacidad para producir suficientes partículas de un modo regulador aceptable. Para muchos sistemas víricos, esta meta está al alcance y una serie de sistemas de vector han producido perfiles positivos de respuesta inmune y seguridad en ensayos clínicos. Sin embargo, la mayoría de los esquemas de producción para plataformas de vector de vacuna están enfocadas a la producción de grandes cantidades de partículas de vacuna que expresan un único antígeno o como mucho dos o tres antígenos conocidos para dianas de enfermedades específicas, p.ej., los genes *gag*, *pol* y *env* de VIH en vectores de poxvirus. Sin embargo, en la mayoría de los casos, estas estrategias de fabricación a gran escala no son prácticas para la fabricación de vacunas específicas de pacientes individuales.

Los sistemas de administración de vectores alfavirales han sido identificados como vectores de vacuna atractivos por una serie de razones que incluyen: alta expresión de secuencias génicas heterólogas, la derivación de partículas de replicón de (alfa)virus (ARP) no replicante con buenos perfiles de seguridad, un genoma de ARN que se replica en el citoplasma de la célula diana e impide la opción de integración genómica del vector, y finalmente la demostración de que determinados vectores alfavirales están intrínsecamente dirigidos para replicación en células dendríticas y por tanto pueden generar respuestas inmunes fuertes y completas a una multitud de antígenos de vacuna (revisado en Rayner, Dryga y Kamrud, 2002, Rev. Med. Virol. 12: 279-296). El género de alfavirus incluye una variedad de virus, todos los cuales son miembros de la familia Togaviridae. Los alfavirus incluyen el Virus de Encefalitis Equina Oriental (EEE), el Virus de Encefalitis Equina Venezolano (VEE), el Virus Everglades, el Virus Mucambo, el Virus Pixuna, el Virus de Encefalitis Equina Occidental (WEE), el Virus Sindbis, el Virus de Bosque Semliki, el Virus Middleburg, el Virus Chikungunya, el Virus O'nyong-nyong, el Virus Ross River, el Virus de Bosque Barnah, el Virus Getah, el Virus Sagiyama, el Virus Bebaru, el Virus Mayaro, el Virus Una, el Virus Aura, el Virus Whataroa, el Virus Babanki, el Virus Kyzylgach, el Virus Highlands J, el Virus Fort Morgan, el Virus Ndumu y el Virus Buggy Creek. El genoma vírico es un ARN de sentido mensajero de cadena sencilla, modificado en el extremo 5' con un tapón metilado y en el extremo 3' con un tracto poli (A) de longitud variable. Las subunidades estructurales que contienen una proteína vírica individual, C, asociada con el genoma de ARN en una nucleocápsida icosaédrica. En el virión, la cápsida está rodeada por una envoltura de lípido recubierta por un sistema regular de agujas de proteína transmembrana, cada una de las cuales consta de un complejo heterodimérico de dos glicoproteínas, normalmente E1 y E2. Véase Pedersen et al., J. Virol 14: 40 (1974). Los virus Sindbis y de bosque Semliki se

consideran los alfavirus prototipo, y han sido estudiados ampliamente. Véase Schlesinger, "The Togaviridae and Flaviviridae", Plenum Publishing Corp., Nueva York (1986). El virus VEE también ha sido estudiado ampliamente. Véase, p.ej., la Patente de EE.UU. n° 5.185.440, y las otras referencias citadas en ella.

5 Los estudios de estos virus han conducido al desarrollo de técnicas para la vacunación contra las enfermedades de alfavirus y contra otras enfermedades a través del uso de vectores de alfavirus para la introducción de ADN extraño que codifica antígenos de interés. Véase la Patente de EE.UU. n° 5.185.440 a nombre de Davis et al., y la
10 Publicación PCT WO 92/10578. La introducción de ADN ajeno expresable en células eucarióticas se ha convertido en un tema de interés creciente. Es bien sabido que las vacunas víricas vivas atenuadas están entre los métodos más eficaces para controlar enfermedades víricas. Sin embargo, para algunos patógenos víricos (o de otro tipo), la
15 inmunización con una cepa de virus vivo puede no ser práctica o puede ser insegura. Una estrategia alternativa es la inserción de secuencias que codifican antígenos inmunizantes de dichos agentes en una cepa viva replicante de otro virus. Un sistema de este tipo que utiliza un vector de VEE vivo se describe en la Patente de EE.UU. n° 5.505.947 a nombre de Johnson et al. Otro sistema de este tipo se describe en Hahn et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:
20 2679-2683, en donde construcciones de virus Sindbis expresan una forma truncada de la proteína de hemaglutinina de la gripe. Otra estrategia es el uso de partículas infecciosas de alfavirus con defecto de propagación, tal como se describe en la Patente de EE.UU. n° 6.190.666 a nombre de Garoff et al., las Patentes de EE.UU. n° 5.792.462 y
25 6.156.558 a nombre de Johnston et al., US2002015945 (Polo et al.), US2001016199 (Johnston et al.), Frolov et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11371-11377 y Pushko et al. (1997) Virology 239: 389-401. También se ha demostrado que los alfavirus son relativamente fáciles de manipular genéticamente, como se refleja por el número de aplicaciones que emplean alfavirus como bibliotecas de expresión genómica, p.ej., véase la Patente de EE.UU. n°
30 6.197.502. También se ha explorado el uso de vectores de Virus de Bosque Semliki (SFV) que expresan una biblioteca de antígenos en modelos de animales en donde se usaron partículas de SFV que expresan una biblioteca de antígenos tumorales para infectar células dendríticas *in vitro*, y las células dendríticas se usaron para inmunizar ratones que presentaban alguna protección en un modelo de glioma (Yamanaka et al., 2001, J. Neurosurg. 94: 474-81).

El documento de Ludwig et al (1996) J. Virol., vol. 70, pág. 5592-5599 describe un receptor putativo para el virus de encefalitis equina venezolano de células de mosquito y con las características de unión del VEEV. El documento US2002141975 describe la recolección de partículas de alfavirus infecciosas mediante lisis celular o a partir del sobrenadante de un cultivo celular.

30 Existe una necesidad persistente en la técnica de secuencias de ácido nucleico que codifiquen antígenos extraños que puedan usarse para inmunizar a una persona o a un animal contra afecciones neoplásicas o contra infecciones parasitarias o de patógenos, especialmente cuando no hay una cepa atenuada o cuando la neoplasia, el parásito o el patógeno no están bien caracterizados a nivel molecular, o cuando es reconocido que la inmunización protectora requiere de la expresión de antígenos múltiples.

35 Sumario de la invención

La invención es su sentido más amplio es tal como se define en las reivindicaciones independientes.

En la presente memoria se describe una preparación de partículas de replicón de virus derivadas de una célula neoplásica, un patógeno o un parásito, y de composiciones inmunogénicas que las comprenden. La preparación
40 contiene una multiplicidad de secuencias codificadoras expresables derivadas de la célula neoplásica, patógeno o parásito, y la expresión de las secuencias codificadoras en un paciente humano o animal al que se le administra la preparación da como resultado la generación de una respuesta inmune a la multiplicidad de determinantes antigénicos codificados y expresados a partir de un ácido nucleico de replicón de alfavirus. La composición inmunogénica comprende la preparación de partícula de replicón de alfavirus de interés y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y de forma ventajosa también comprende un adyuvante inmunológico y/o una citocina
45 para mejorar o estimular la respuesta inmune. El replicón de alfavirus puede ser cualquier vector de ARN de replicón de alfavirus derivado de virus VEE. En las realizaciones preferidas, el vector de alfavirus contiene una o más mutaciones atenuantes. Las mutaciones adecuadas, así como los métodos para identificarlas, han sido descritas (véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. n° 5.505.947; 5.639.650; 5.811.407).

Las rutas de administración pueden incluir subcutánea (s.c.), intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.), intradérmica (i.d.), intravenosa (i.v.), intratumoral, intracerebral (i.c.), inoculación directa a nodos linfáticos (i.n.), y rutas mucosales
50 tales como las rutas nasal, bronquial, intrarrectal, intravaginal y oral. La administración intramuscular es ventajosa.

Las dosificaciones en humanos y animales puede oscilar entre aproximadamente 1×10^4 y aproximadamente 1×10^{10} , de forma ventajosa en una dosis de aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^8 por dosis. Para las estrategias inmunogénicas de tipo vacuna, los presentes inventores contemplan dosis semanales, quincenales o mensuales durante un periodo de aproximadamente 1 a aproximadamente 12 meses, o más. Esto puede venir
55 seguido de vacunaciones de recuerdo, en base a la necesidad, p.ej., anualmente.

Especialmente en el caso en el que la preparación de replicón de alfavirus deriva de células tumorales procedentes de un paciente específico, se fabrica una preparación de vacuna específica del paciente y se administra de vuelta al

mismo individuo; es decir, la estrategia de vacuna autóloga. También entra dentro del alcance de la presente descripción una estrategia alogénica, en la que la población de replicón vírico derivado de las células tumorales de un paciente es administrada a otro paciente que padece, o que se sospecha que padece o que están en riesgo de padecer, la misma afección neoplásica. Un ejemplo de un paciente de riesgo elevado es un individuo con una predisposición genética o con un riesgo alto hereditario demostrado de cáncer. Por ejemplo, el cáncer de mama está asociado a un riesgo familiar elevado en los miembros femeninos de la familia de pacientes con cáncer de mama. De forma similar, se podría vacunar a un individuo positivo en VIH y al mismo tiempo, vacunar profilácticamente a su pareja no infectada con la misma preparación de vacuna para intentar prevenir que el individuo no infectado se infecte.

La presente descripción además abarca el seguimiento de las respuestas inmunes provocadas por la administración de una preparación de replicón de virus o de una composición inmunogénica que comprenda la misma a un paciente para identificar los antígenos tumorales a los que el paciente ha respondido. Dichas respuestas pueden ser humorales y/o celulares. Esta estrategia permite la identificación de nuevos antígenos y permite el uso de una población más definida de antígenos con los que inmunizar al paciente. Esto puede realizarse administrando inyecciones con preparaciones de ARP más limitadas o llevando a cabo inmunizaciones posteriores de otros pacientes o individuos (en un régimen profiláctico) con el conjunto más definido de preparaciones inmunogénicas que contienen ARP codificadoras de antígenos.

La presente descripción también se refiere al tratamiento y/o la preparación de enfermedades infecciosas e infestaciones parasitarias. Usando el VIH como ejemplo, una vacuna eficaz de ARP VIH multi-antigénica derivada de un gen o genes de VIH específicos del paciente directamente de la propia población vírica del individuo, se puede aplicar a personas infectadas con una cepa genética similar del virus o a personas expuestas, con probabilidad de ser expuestas o potencialmente expuestas a una cepa similar. Particularmente, nuevos inmunógenos o inmunogénicos procedentes del patógeno o parásito de interés pueden identificarse usando los ARPs como herramienta para identificar nuevas proteínas inmunogénicas. De forma similar, se pueden combinar múltiples cepas de un virus causante de enfermedad (tal como los subtipos reconocidos de VIH) o parásitos en una preparación de ARP para proporcionar composiciones robustas inmunogénicas que no son específicas de cepa. Por ejemplo, se han reconocido varios subtipos diferentes de VIH, y pueden combinarse para proporcionar una vacuna de VIH multi-tipo.

En el caso de pacientes de cáncer, la administración de ARPs que portan secuencias codificadoras expresables de determinantes antigénicos de célula cancerosa se acompaña de forma ventajosa de tratamientos quimioterapéuticos, especialmente cuando los tratamientos quimioterapéuticos no afectan a la capacidad del sistema inmune para responder a antígenos expresados después de la administración de composiciones inmunogénicas que comprenden los ARPs descritos en la presente memoria.

Las preparaciones de ARP descritas en la presente memoria, que expresan antígenos característicos de un tipo particular de tumor o de cáncer, un patógeno vírico, bacteriano, fúngico o de protozoo, o de un parásito, pueden administrarse en regímenes de tratamiento profiláctico o terapéutico, y la administración de los ARPs pueden llevarse a cabo en combinación con otras preparaciones inmunogénicas para imprimir y/o inyectar, por ejemplo, usando una vacuna de ARP de imprimación y una inyección de vacuna de célula dendrítica, o un ARP de imprimación y una inyección de vector adenovírico. Todas las posibles combinaciones de ADN, ARN, adenovirus, picornavirus, virus adenoasociados, poxvirus, retrovirus, aftovirus, nodavirus, flavivirus, célula dendrítica, péptidos, proteínas de choque térmico, minigenes, células tumorales completas y vacunas de lisato celular tumoral, pueden usarse en conjunción con los ARPs que expresan una multiplicidad de antígenos de interés. Se pueden utilizar adyuvantes tales como citocinas o quimiocinas, o ARPs que dirigen la expresión de quimiocinas o citocinas, en las preparaciones descritas en la presente memoria. La adición de imprimaciones/inyecciones heterólogas en combinación con los ARP que expresan una multiplicidad de genes probablemente sería con los replicones de vector o los conjuntos de replicones de vector que expresan un único antígeno tumoral o un número relativamente pequeño de antígenos tumorales. Esto funciona para dirigir al sistema inmune contra antígenos específicos después o antes de una respuesta inmune más amplia provocada por el(los) ARP(s). De forma similar, dichos sistemas de administración heterólogos puede usarse en combinación con las presentes bibliotecas de expresión de replicón de alfavirus para potenciar y/o mantener la memoria de adición y las funciones inmunes a largo plazo.

En la presente memoria se describe la administración de las composiciones inmunogénicas que contienen ARP descritas a un humano no solo para tratar el cáncer u otros estados patológicos en un sistema terapéutico en el que el paciente es positivo para un tumor, patógeno o parásito, sino también una vez que el tratamiento ha tenido éxito y el paciente está en remisión. Dicha inmunización periódica continuada (de recuerdo) puede facilitar el mantenimiento de un estado libre de tumor, libre de enfermedad o libre de parásitos, y evitar la regresión o la recurrencia del tumor o enfermedad, respectivamente.

En la presente memoria también se describe la administración de las composiciones inmunogénicas que contienen ARP descritas a un animal (p.ej., caballo, cerdo, vaca, cabra, primate, conejo, ratón, hámster, ave) para generar respuestas inmunes, tal como anticuerpos. Los sueros o células recolectados de dichos animales son útiles para proporcionar sueros o células clínicas para la producción de hibridomas que generen sueros monoclonales, tales como preparaciones de anticuerpos que son útiles en aplicaciones de investigación, diagnóstico y terapia.

Un objeto de la invención es un método para preparar partículas de replicón alfavirales (ARPs) que de forma colectiva codifican una multiplicidad de antígenos a partir de un tumor, célula tumoral, patógeno o parásito. El método de la invención se define en las reivindicaciones anexadas a esta descripción. El método puede incluir las etapas de preparar ADN o ADNc del tumor, una célula tumoral, patógeno o parásito de interés, y clonar en el ácido nucleico de replicón de virus/alfavirus para producir un ácido nucleico de replicón de virus/alfavirus modificado, introducir el ácido nucleico de replicón de virus/alfavirus modificado en una célula permisiva, conteniendo dicho ácido nucleico de replicón de virus/alfavirus modificado al menos una señal de paquete vírico para producir una célula permisiva modificada, cultivar la célula permisiva modificada en las condiciones que permitan la expresión de al menos una función colaboradora y permitir la replicación de dicho ácido nucleico vírico/alfaviral modificado y empaquetar para formar ARPs, y de forma deseable poner en contacto las células permisivas cultivadas con un Medio de Liberación para liberar ARPs unidos a células y a restos celulares. El ácido nucleico de replicón vírico/alfaviral modificado puede introducirse en células permisivas que ya contengan y expresen secuencias codificadoras requeridas para empaquetar, o una o más moléculas de ADN o ARN "colaboradoras" que portan genes de empaquetamiento pueden introducirse junto con el ácido nucleico de replicón vírico/alfaviral modificado. Opcionalmente, la etapa de Medio de Liberación puede venir precedida por una etapa de lavado que no da como resultado la liberación de los ARPs desde las células. De forma ventajosa la etapa de lavado incluye un tratamiento con ADNasa, o se puede digerir el ADN en una preparación de ARP con ADNasa. La ADNasa, por ejemplo, procedente de *Serratia marcescens*, puede usarse en una concentración de 10-1000 unidades por mL, con una incubación de 10 a 60 minutos a 37°C. El Medio de Liberación es un medio acuoso que de forma deseable tiene un pH de entre 6 y 9, de forma deseable entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8,5, y que contiene entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 5 M de una sal que incluye, aunque sin limitación, acetato de amonio, cloruro de amonio, cloruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, cloruro de potasio, sulfato de amonio y bicarbonato de sodio. Es ventajoso que cuando los ácidos nucleicos de replicón alfavirales modificados sean introducidos en las células permisivas mediante electroporación, las células estén presentes en una densidad de entre aproximadamente 10^7 y aproximadamente 5×10^8 por mL de mezcla de electroporación.

De forma ventajosa, las células en las que van a producirse los ARPs están sincronizadas en la fase G2/M del ciclo celular antes de la electroporación con el vector de replicón de alfavirus y el(los) ácido(s) nucleico(s). Sin pretender establecer ninguna teoría particular, se cree que en dichas células en fase G2/M se alcanza una mayor eficacia de electroporación y una mayor transferencia de ácido nucleico al núcleo (en las realizaciones de la invención que implican actividad nuclear) de la célula electroporada.

Breve descripción de la figura

La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra las respuestas inmunes específicas de antígeno en animales vacunados con ARP multi-antigénico. Las respuestas inmunes específicas de antígeno (en forma de inmunidad humoral) determinadas mediante ELISA y presentadas como la media geométrica recíproca del título, o mediante análisis de transferencia Western blot o IFA y presentadas como la dilución más baja para la cual fue detectable la señal específica de antígeno. Las respuestas inmunes específicas de antígeno en forma de inmunidad celular medida mediante detección ELISPOT de células secretoras de IFN- γ y presentada como linfocitos secretores de IFN- γ específicos de antígeno por cada 10^6 linfocitos. Los animales que recibieron la preparación de ARP multi-antigénica a través de una ruta de inoculación subcutánea (s.c.) o intraperitoneal (i.p.) montaron respuestas inmunes específicas solo de Gag. Los animales de control negativo no presentaron respuesta detectable frente a ningún antígeno.

Descripción detallada de la invención

La invención en su más amplio sentido es tal como se define en las reivindicaciones independientes.

En el contexto de la presente solicitud, nm significa nanómetro, mL significa mililitro, μ L significa microlitro, pfu/mL significa unidades formadoras de placa/mililitro, iu significa unidades infecciosas, VEE significa virus de Encefalitis Equina Venezolana, EMC significa virus de Encefalomiocarditis, BHK significa células de riñón de hámster bebé, HA significa gen de hemaglutinina, CAT significa cloranfenicol acetil transferasa, β -gal significa β -galactosidasa, GFP significa gen de proteína verde fluorescente, N significa nucleocápsida, FACS significa clasificador celular activado por fluorescencia, ELISA significa ensayo inmunosorbente ligado a enzima, e IRES significa sitio de entrada de ribosoma interno. La expresión "número de aminoácido E2 (p.ej., Lys, Thr, etc.)" indica un aminoácido designado en el residuo designado del gen E2, y también se usa para referirse a aminoácidos en los residuos específicos del gen E1.

El término "alfavirus" tiene su significado convencional en la técnica, e incluye las diversas especies de alfavirus, tales como Virus de Encefalitis Equina Oriental (EEE), el Virus de Encefalitis Equina Venezolano (VEE), el Virus Everglades, el Virus Mucambo, el Virus Pixuna, el Virus de Encefalitis Equina Occidental (WEE), el Virus Sindbis, el Arbovirus Surafricano nº86, el Virus de Bosque Semliki, el Virus Middleburg, el Virus Chikungunya, el Virus O'nyong-nyong, el Virus Ross River, el Virus de Bosque Barmah, el Virus Getah, el Virus Sagiyama, el Virus Bebaru, el Virus Mayaro, el Virus Una, el Virus Aura, el Virus Whataroa, el Virus Babanki, el Virus Kyzylgach, el Virus Highlands J, el Virus Fort Morgan, el Virus Ndumu y el Virus Buggy Creek. Los transcritos de ARN de alfavirus para uso en la

presente invención proceden del virus VEE. También se describen transcritos de ARN de alfavirus procedentes de Virus Sindbis, de Arbovirus Surafricano nº86, y el Virus de Bosque Semliki.

Las células permisivas de alfavirus empleadas en los métodos de la presente invención son células que, tras transfección con un transcrito de ARN alfaviral, son capaces de producir partículas víricas. Los alfavirus presentan un amplio rango de hospedantes. Los ejemplos de células hospedantes adecuadas incluyen, aunque sin limitación, células Vero, de riñón de hámster bebé (BHK), DF1, CHO, 293, 293T, de fibroblasto de embrión de pollo, y células de insecto tal como células SF21, *Spodoptera frugiperda*; C6/36, *Aedes albopictus*; TRA-171, *Toxorhynchites amboinensis*; RML-12, *Aedes aegypti*; AP-61, *Aedes pseudoscutellaris*; y MOS-55, *Anopheles gambiae*.

Las frases "proteína estructural" o "proteína estructural de alfavirus" tal como se usan en la presente memoria se refieren a proteínas codificadas víricamente que son requeridas para la encapsidación del replicón de ARN en una partícula de replicón, e incluyen la proteína de cápsida, la glicoproteína E1 y la glicoproteína E2. Tal como se describe en la presente memoria, las proteínas estructurales de los alfavirus se distribuyen entre uno o más ácidos nucleicos colaboradores. Por ejemplo, se puede usar un primer ARN colaborador y un segundo ARN colaborador, o un único ADN colaborador que codifica todas las proteínas estructurales de alfavirus. Adicionalmente, una o más proteínas estructurales pueden estar localizadas en la misma molécula de ARN que el ARN de replicón, siempre que se elimine al menos una proteína estructural del ARN de replicón de tal modo que el replicón y la partícula de alfavirus resultante sean defectuosas en propagación. Tal como se usan en la presente memoria, los términos "eliminado" o "eliminación" significan la eliminación total del segmento especificado o la eliminación de una porción suficiente del segmento especificado para hacer que el segmento sea inoperativo o no funcional, según el uso estándar. Véase, p.ej., la Patente de EE.UU. nº 4.650.764 a nombre de Termin et al. El término "defectuoso en replicación" tal como se usa en la presente memoria es sinónimo de "defectuoso en propagación", y significa que las partículas producidas en una célula hospedante dada no pueden producir partículas de progenie en la otra célula hospedante, debido a la ausencia de la función colaboradora, es decir, de las proteínas estructurales de alfavirus requeridas para el empaquetamiento del ácido nucleico de replicón. Sin embargo, el ácido nucleico de replicón es capaz de replicarse a sí mismo y ser expresado dentro de la célula hospedante en la que ha sido introducido.

La célula colaboradora, también denominada célula de empaquetamiento, usada para producir las partículas de alfavirus defectuosas en propagación, deben expresar o ser capaces de expresar proteínas estructurales de alfavirus suficientes para empaquetar el ácido nucleico de replicón. Las proteínas estructurales pueden ser producidas a partir de un conjunto de ARNs, típicamente dos, que son introducidos en la célula colaboradora simultáneamente o antes de la introducción del vector de replicón. El primer ARN colaborador incluye ARN que codifica al menos una proteína estructural de alfavirus pero no codifica todas las proteínas estructurales de alfavirus. El primer ARN colaborador puede comprender ARN que codifica la glicoproteína E1 de alfavirus, pero no que codifica la proteína de cápsida de alfavirus y la glicoproteína E2 de alfavirus. Alternativamente, el primero ARN colaborador puede comprender ARN que codifica la glicoproteína E2 de alfavirus, pero que no codifica la proteína de cápsida de alfavirus ni la glicoproteína E1 de alfavirus. En una realización adicional, el primer ARN colaborador puede comprender ARN que codifica la glicoproteína E1 de alfavirus y la glicoproteína E2 de alfavirus, pero no la proteína de cápsida de alfavirus. En una cuarta realización, el primer ARN colaborador puede comprender ARN que codifica la cápsida de alfavirus, pero ninguna de las glicoproteínas de alfavirus. En una quinta realización, el primer ARN colaborador puede comprender ARN que codifica la cápsida y una de las glicoproteínas, es decir, la E1 o la E2, pero no ambas.

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

En todos los ácidos nucleicos colaboradores, se entiende que dichas moléculas comprenden además secuencias necesarias para la expresión (que abarcan la traducción y cuando es apropiado, señales de transcripción o replicación) de las secuencias de proteínas estructurales codificadas en las células colaboradoras. Dichas secuencias pueden incluir, por ejemplo, promotores (víricos, procarióticos o eucarióticos, inducibles o constitutivos) y secuencias de reconocimiento de replicasa vírica 5' y 3'. En el caso de ácidos nucleicos colaboradores que expresan una o más glicoproteínas, se entiende en la técnica que dichas secuencias se expresan de forma ventajosa con una secuencia líder o señal en el extremo N de la región codificadora de la proteína estructural en las construcciones de ácido nucleico. La secuencia líder o señal puede derivarse del alfavirus, por ejemplo E3 ó 6k, o puede ser una secuencia heteróloga tal como un péptido señal activador de plasminógeno o una secuencia sintética. Por tanto, como ejemplo, un primer ácido nucleico colaborador puede ser una molécula de ARN que codifica cápsida-E3-E1, y el segundo ácido nucleico colaborador puede ser una molécula de ARN que codifica cápsida-E3-E2. Alternativamente, el primer ARN colaborador puede codificar solo cápsida, y el segundo ARN colaborador puede

codificar E3-E2-6k-E1. Adicionalmente, la señal de empaquetamiento o "secuencia de encapsidación" que está presente en el genoma vírico no está presente en todos los ácidos nucleicos colaboradores. Preferiblemente, la señal de empaquetamiento es eliminada de todos los ácidos nucleicos colaboradores.

Estos ARN colaboradores pueden introducirse en las células de varios modos. Pueden expresarse a partir de una o más casetes de expresión que han sido transformadas de forma estable en las células, estableciendo así líneas celulares de empaquetamiento (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n.º 6.242.259). Alternativamente, los ARNs pueden ser introducidos como moléculas de ARN o ADN en la célula colaboradora sin integrarse en el genoma celular. Los métodos de introducción incluyen electroporación, vectores víricos (p.ej., SV40, adenovirus, nodavirus, astrovirus), y transfección mediada por lípidos. En la invención reivindicada, el método de introducción es la electroporación.

Una alternativa a los ARNs colaboradores múltiples es el uso de una única molécula de ácido nucleico que codifica todas las funciones necesarias para replicar el ARN de replicón vírico y sintetizar los polipéptidos necesarios para empaquetar el ARN de replicón alfaviral en partículas de replicón de alfavirus infecciosas. Esto puede lograrse con una molécula de ARN que determina las funciones necesarias o con una molécula de ADN que determina las funciones necesarias. El ácido nucleico de ADN colaborador individual puede introducirse en la célula de empaquetamiento mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, electroporación, transfección mediada por lípidos, vector vírico (p.ej., adenovirus o SV-40), y transfección mediada por fosfato. En la invención reivindicada, el ADN se introduce mediante métodos basados en electroporación de esta invención, con el voltaje y la capacitancia optimizados para las células y el(los) ácido(s) nucleico(s) que se esté(n) introduciendo. El ADN típicamente es electroporado en las células con un descenso del voltaje y un aumento de la capacitancia, en comparación con lo requerido para la captación de ARN. En todas las electroporaciones, el valor correspondiente al voltaje y la capacitancia deben fijarse para evitar destruir la capacidad de las células de empaquetamiento para producir partículas de alfavirus infecciosas. El ADN fue purificado intensivamente para eliminar contaminantes tóxicos y se concentró hasta aproximadamente 5 mg/mL antes de la electroporación. Generalmente, es preferible concentrar el ADN a entre 1-8 mg/mL, preferiblemente entre 5 y 8 mg/mL. El ADN colaborador está presente en la mezcla de electroporación en aproximadamente 20-500, de forma deseable entre aproximadamente 50 y aproximadamente 300, por ejemplo aproximadamente 150 µg por cada 0,8 mL de mezcla de electroporación, y contiene de 10^7 a 5×10^8 células por mL, de forma deseable contiene entre aproximadamente 5×10^7 y aproximadamente 2×10^8 células, por ejemplo, aproximadamente $1,2 \times 10^8$ células.

Alternativamente, la función colaboradora, en este formato y bajo un promotor inducible, puede incorporarse al genoma de la célula de empaquetamiento antes de la introducción/expresión del ácido nucleico de replicón de vector de ARN vírico, e inducirse entonces mediante el estímulo apropiado justo antes, simultáneamente, o después de la introducción del replicón de vector de ARN.

De forma ventajosa, el ácido nucleico que codifica las proteínas estructurales de alfavirus, es decir, la cápsida, la glicoproteína E1 y la glicoproteína E2, contiene al menos una mutación atenuante. Las frases "mutación atenuante" y "aminoácido atenuante", tal como se usan en la presente memoria, significan una mutación de nucleótido o un aminoácido codificado como consecuencia de dicha mutación, que da como resultado una probabilidad disminuida de causar enfermedad en su hospedante (es decir, una pérdida de virulencia), según la terminología estándar en la técnica. Véase, p.ej., B. Davis, et al. *Microbiology* 132 (3ª ed. 1980), según la mutación sea una mutación de sustitución, o una mutación de eliminación o adición en marco. La frase "mutación atenuante" excluye mutaciones que serían letales para el virus a menos que dicha mutación se use en combinación con una mutación "restaurante" que hace el virus viable, aunque atenuado. En realizaciones específicas, el(los) aminoácido(s) colaborador(es) incluye(n) al menos una mutación atenuante.

Los métodos para identificar mutaciones atenuantes en el genoma de alfavirus son conocidos en la técnica. Olmsted et al. (1984; *Science* 225: 424) describe un método para identificar mutaciones atenuantes en el virus de Sindbis seleccionando en términos de crecimiento rápido en cultivo celular. Johnston y Smith (1988; *Virology* 162: 437) describe la identificación de mutaciones atenuantes en VEE aplicando una presión selectiva directa para penetración acelerada de células BHK. En la técnica se han descrito mutaciones atenuantes en alfavirus, p.ej., White et al. 2001 *J. Virology* 75: 3706; Kinney et al. 1989 *Virology* 70: 19; Heise et al. 2000 *J. Virology* 74: 4207; Bernard et al 2000 *Virology* 276: 93; Smith et al 2001 *J. Virology* 75: 11196; Heidner y Johnston 1994 *J. Virology* 68: 8064; Klimstra et al. 1999 *J. Virology* 73: 10387; Glasgow et al. 1991 *Virology* 185: 741; Polo y Johnston 1990 *J. Virology* 64: 4438; y Smerdou y Liljestrom 1999 *J. Virology* 73: 1092.

En determinadas realizaciones, el ARN de replicón comprende al menos una mutación atenuante. En otras realizaciones específicas, la(s) molécula(s) de ácido nucleico colaborador incluye(n) al menos una mutación atenuante. En la realización que comprende dos moléculas de ácido nucleico colaborador, al menos una molécula incluye al menos una población atenuante, o ambas pueden codificar al menos una mutación atenuante. Alternativamente, el ácido nucleico colaborador, o al menos uno del primer o segundo ácidos nucleicos colaboradores incluye al menos dos, o múltiples, mutaciones atenuantes. Las mutaciones atenuantes apropiadas dependen del alfavirus usado. Por ejemplo, cuando el alfavirus es VEE, las mutaciones atenuantes adecuadas pueden seleccionarse del grupo que consiste en codones en la posición 76 del aminoácido E2 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina, arginina o histidina como aminoácido 76 de E2; codones en la posición

120 del aminoácido E2 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina como aminoácido 120 de E2; codones en la posición 209 del aminoácido E2 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina, arginina o histidina como aminoácido 209 de E2; codones en la posición 272 del aminoácido E1 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente treonina o serina como aminoácido 272 de E1; codones en la posición 81 del aminoácido E1 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente isoleucina o leucina como aminoácido 81 de E1; y codones en la posición 253 del aminoácido E1 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente serina o treonina como aminoácido 253 de E1. Otras mutaciones atenuantes adicionales incluyen mutaciones de eliminación o sustitución en el dominio de ruptura entre E3 y E2, de tal modo que no se rompa la poliproteína E3/E2; esta mutación en combinación con la mutación en E1-253 es una cepa atenuada preferida para uso en esta invención. De forma similar, las mutaciones presentes en cepas de vacunas vivas existentes, p.ej. la cepa TC83 (véase Kinney et al., 1989, Virology 170: 19-30, particularmente la mutación en el nucleótido 3), también se emplean de forma ventajosa en las partículas purificadas mediante los métodos de esta invención. Un ejemplo de una mutación atenuante en la región no codificadora del ácido nucleico de replicón es la sustitución de A o C en el nucleótido 3 de VEE.

Los ARNs de replicón vírico y colaborador adecuados se describen en la Patente de EE.UU. nº 6.156.558.

Aunque no es parte de la presente invención, el Arbovirus Surafricano nº 86 (S.A. AR86) puede comprender mutaciones atenuantes adecuadas seleccionadas del grupo que consiste en los codones de nsP1 posición de aminoácido 538 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente isoleucina como nsP1 aminoácido 538; los codones de E2 posición de aminoácido 304 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente treonina como E2 aminoácido 304; los codones de E2 posición de aminoácido 314 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina como E2 aminoácido 314; los codones de E2 posición de aminoácido 376 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente alanina como E2 aminoácido 376; los codones de E2 posición de aminoácido 372 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente leucina como E2 aminoácido 372; los codones de nsP2 posición de aminoácido 96 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente glicina como nsP2 aminoácido 96; y los codones de nsP2 posición de aminoácido 372 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente valina como nsP2 aminoácido 372. Las mutaciones atenuantes útiles en otros alfavirus son conocidas por los especialistas en la técnica.

Las mutaciones atenuantes pueden introducirse en el ácido nucleico llevando a cabo una mutagénesis sito-dirigida, de acuerdo a procedimientos conocidos. Véase Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488 (1985). Alternativamente, se pueden introducir mutaciones en el ácido nucleico reemplazando fragmentos de restricción homólogos, según procedimientos conocidos, o mediante métodos de reacción en cadena de polimerasa mutagénicos.

Una vez se han generado el(los) ácido(s) nucleico(s) colaborador(es) y los ARNs de replicón para uso en la producción de ARPs, son introducidos en células hospedantes adecuadas, de forma deseable mediante electroporación. Los presentes inventores descubrieron que la electroporación llevada a cabo con una densidad celular relativamente elevada permite una captación eficiente de ácido nucleico colaborador y de ARNs de replicón de virus. Los ácidos nucleicos de replicón y colaboradores deberían ser purificados para su uso en electroporación o en otros protocolos de introducción de ácidos nucleicos en células para producción de ARP, pero no es necesario tapar los ARNs colaboradores.

La etapa de producción de las partículas víricas infecciosas en las células también puede llevarse a cabo usando técnicas convencionales. Véase, p.ej., la Patente de EE.UU. nº 5.185.440 a nombre de Davis et al., Publicación PCT nº WO 92/10578 a nombre de Biooption AB, y la Patente de EE.UU. nº 4.650.764 a nombre de Temin et al. (aunque Temin et al., se refiere a retrovirus más que a alfavirus). Las partículas víricas infecciosas pueden producirse mediante técnicas de cultivo celular estándares mejoradas mediante los procedimientos descritos en la presente memoria y/o mediante técnicas de recolección de partículas convencionales, o el procedimiento de lavado de sal descrito en la presente memoria más adelante. El lavado de sal parece mejorar la recuperación de ARP, especialmente cuando existen determinadas cargas superficiales en la superficie del ARP. En el caso de VEE, los residuos de aminoácido en E2-309 y E2-120 proporcionan buenos sitios para introducir una carga positiva.

Los ARNs de replicón vírico codifican múltiples secuencias codificadoras heterólogas que están ligadas operativamente a promotores y otras secuencias requeridas para la expresión transcripcional y traduccional de la secuencia codificadora en la célula hospedante en la que se van a introducir y expresar los ARPs.

Cualesquier aminoácidos que existen en las secuencias de aminoácidos referidas en la especificación presentan sus abreviaturas habituales de una letra y de tres letras utilizadas rutinariamente en la técnica: A, Ala, Alanina; C, Cys, Cisteína; D, Asp, Ácido Aspártico; E, Glu, Ácido Glutámico; F, Phe, Fenilalanina; G, Gly, Glicina; H, His, Histidina; I, Ile, Isoleucina; K, Lys, Lisina; L, Leu, Leucina; M, Met, Metionina; N, Asn, Asparagina; P, Pro, Prolina; Q, Gln, Glutamina; R, Arg, Arginina; S, Ser, Serina; T, Thr, Treonina; V, Val, Valina; W, Try, Triptófano; Y, Tyr, Tirosina.

Tal como se usa en la presente memoria, "expresión" dirigida por una secuencia particular es la transcripción de una secuencia asociada en dirección 3'. Si es apropiado y se desea para la secuencia asociada, el término expresión también abarca la traducción (síntesis de proteína) del ARN transcrito. Alternativamente, se pueden usar diferentes secuencias para dirigir la transcripción y la traducción.

El ADN genómico (en donde los genes no están interrumpidos por intrones y/o donde no es una proporción significativa del genoma dedicado a secuencias altamente repetidas o no expresadas) o ADNc se clona en una preparación de ácido nucleico de vector vírico preparado adecuadamente para producir una preparación de ácido nucleico de vector recombinante. A continuación la preparación de ácido nucleico de vector recombinante se introduce en células que permitan el empaquetamiento de los ácidos nucleicos de vector recombinante en partículas infecciosas. La preparación de ácido nucleico de vector recombinante puede ser electroporada en células para empaquetamiento junto con ácidos nucleicos colaboradores, ARN o ADN, en una electroporación de densidad celular relativamente alta, p.ej. de aproximadamente 10^7 a aproximadamente 10^9 células/mL de mezcla de electroporación. En la invención reivindicada, el ácido nucleico de replicón se introduce en la célula hospedante mediante electroporación, y la densidad celular en el entorno de electroporación es de 10^7 a 5×10^8 por mL. A continuación las células son cultivadas en medio de cultivo para permitir el empaquetamiento de los ácidos nucleicos de vector recombinante en partículas de replicón vírico.

Después de que los ARPs han sido recolectados de las células mediante lavado con sal, y de forma deseable han sido recolectados del sobrenadante libre de células, los ARPs pueden purificarse parcialmente mediante cromatografía de intercambio iónico.

Los métodos de la presente invención se aplican a ácidos nucleicos de replicón vírico derivados del virus de encefalitis equina venezolana (VEE). Un ejemplo específico de VEE atenuado es la cepa 3014, virus que puede ser purificado, o los ARPs derivados del mismo, usando cromatografía de afinidad de heparina. La cepa de VEE 3042 es otro virus atenuado adecuado para uso en métodos de ARP, pero la cubierta de este virus, o de los ARPs derivados del mismo, no puede purificarse usando cromatografía de afinidad de heparina. Los virus, o los ARPs derivados de los mismos, que portan mutaciones que les confieren capacidad de unión a glucosaminoglucano están particularmente indicados para la purificación mediante la etapa de lavado con sal, y también puede ser purificados adicionalmente usando cromatografía de afinidad de heparina.

Los cánceres (afecciones neoplásicas) de los que pueden obtenerse células para uso en los métodos de la presente invención incluyen carcinomas, sarcomas, leucemias y cánceres derivados de células del sistema nervioso. Éstos incluyen, aunque sin limitación: tumores cerebrales, tales como astrocitoma, oligodendroglioma, ependimoma, méduloblastomas y Tumor Ectodérmico Neural Primitivo (PNET); tumores pancreáticos, tales como adenocarcinomas ductales pancreáticos; tumores de pulmón, tales como adenocarcinomas de célula pequeña y grande, carcinoma de célula escamosa y brocoalveolarcarcinoma; tumores de colon, tales como adenocarcinoma epitelial y metástasis hepática de dichos tumores; tumores hepáticos, tales como hepatoma y colangiocarcinoma; tumores de mama, tales como adenocarcinoma ductal y lobular; tumores ginecológicos, tales como carcinoma escamoso y adenocarcinoma de la cerviz uterina, y adenocarcinoma epitelial uterino y de ovario; tumores de próstata, tales como adenocarcinoma prostático; tumores de vejiga, tales como carcinoma de célula escamosa transicional; tumores del sistema reticuloendotelial (RES), tal como linfoma de células B y T (nodular y difuso), plasmacitoma y leucemia aguda y crónica; tumores de la piel, tal como melanoma; y tumores de tejido blando, tales como sarcoma de tejido blando y leiomiomasarcoma.

Los términos "célula neoplásica", "célula tumoral" o "célula cancerosa", usadas tanto en singular como en plural, se refieren a células que han sufrido una transformación maligna que las hace dañinas para el organismo hospedante. Las células cancerosas primarias (esto es, las células obtenidas del entorno del sitio de transformación maligna) pueden distinguirse fácilmente de las células no cancerosas mediante técnicas bien establecidas, particularmente mediante examen histológico. La definición de una célula cancerosa, tal como se usa en la presente memoria, incluye no solo una célula cancerosa primaria, sino también cualquier célula derivada de un ancestro de célula cancerosa. Esto incluye células cancerosas metastatizadas, y los cultivos *in vitro* y las líneas celulares derivadas de células cancerosas. Cuando se hace referencia a un tipo de cáncer que se manifiesta normalmente como un tumor sólido, un tumor "clínicamente detectable" es aquel que es detectable en base a la masa tumoral; p.ej., mediante procedimientos tales como un escáner CAT, imágenes de resonancia magnética (IRM), rayos-X, ultrasonidos o palpación. Los descubrimientos inmunológicos o bioquímicos por sí solos pueden ser insuficientes para cumplir esta definición.

Los patógenos para los cuales las respuestas inmunológicas de antígenos múltiples son ventajosas incluyen patógenos víricos, bacterianos, fúngicos y protozoos. Los virus para los cuales es deseable la inmunidad incluyen, aunque sin limitación, virus de fiebre hemorrágica (tales como el virus del Ébola), virus de inmunodeficiencia (tales como los virus de inmunodeficiencia felina o humana), herpesvirus, coronavirus, adenovirus, poxvirus, retrovirus, aftovirus, nodavirus, picornavirus, ortomixovirus, paramixovirus, rubeola, togavirus, flavivirus, bunyavirus, reovirus, virus oncogénicos tales como retrovirus, alfavirus patogénicos (tales como el virus de bosque Semliki o el virus Sindbis), rinovirus, virus de hepatitis (Grupo B, C, etc.), virus de la gripe, entre otros. Los patógenos bacterianos para los cuales las respuestas inmunes son útiles incluyen, sin limitación, estafilococos, estreptococos, neumococos, salmonela, escherichiae, yersiniae, enterococos, clostridia, corinabacteria, hemófilus, bacteroides, francisela, pasteuriae, brucelae, micobacteriae, bordetela, espirochetes, actinomicetes, clamidiae, micoplasmas, rickettsiae, y otros. Los hongos patogénicos de interés incluye, aunque sin limitación, cándida, criptococos, blastomicetes, histoplasma, coccidioides, ficomicetes, tricodermas, aspergilli, neumocistis, y otros. Los protozoos para los cuales la inmunidad es útil incluyen, sin limitación, plasmodia, esquistosomas, amebas, giardia, babesia, leishmania y otros. Otros parásitos incluyen gusanos redondos, gusanos de gancho y gusanos de cinta, filaria y otros.

Una de las fortalezas de la presente tecnología de vector de replicón de alfavirus es la capacidad para expresar más de un gen extraño. Hasta la fecha, las vacunas de replicón alfaviral se han limitado a la expresión de genes heterólogos individuales o de un puñado de genes heterólogos. Esta capacidad para expresar más de un gen heterólogo se ha alcanzado a través de la adición de múltiples unidades de promotor para conducir la expresión de los genes de cada individuo. El número de genes heterólogos que puede portar un vector de replicón está en última opción limitado por la estructura de cápsida que está limitada por la cantidad de ácido nucleico que puede acomodar. Una estrategia alternativa para replicones individuales que expresan dos o más antígenos es administrar un cóctel de partículas de replicón de alfavirus individuales, que codifica y expresa cada una antígenos diferentes para provocar una respuesta inmune contra múltiples antígenos y/o agentes infecciosos, tal como se describe en la presente memoria. Hasta la fecha, estas estrategias se han limitado a la expresión de tan solo unos pocos antígenos al mismo tiempo (~3), tanto en el multi-promotor como en el establecimiento del cóctel de replicón.

Sin embargo, las recientes mejoras en la tecnología de proceso, como las descritas en la presente memoria, para la generación de partículas de replicón de alfavirus han abierto la puerta a nuevas oportunidades en la vacunación contra múltiples antígenos en la misma preparación de vacuna. Las mejoras del proceso se basan en un método de electroporación de alta densidad celular (concentración celular de 5×10^7 a $1,5 \times 10^8$ células/mL de mezcla de electroporación) y en técnicas de lavado con sal. Otras mejoras incluyen el uso de moléculas de ARN sin tapar (o tapadas) o moléculas de ADN en el mezcla de electroporación. Los rendimientos obtenidos con estas mejoras se han incrementado entre 2 y 3 órdenes de magnitud (hasta 10^{11} i.u. pueden producirse a partir de una única cubeta de electroporación). Estos significativos aumentos de la eficacia de la producción de replicones sobre la técnica existente significan que una serie de estrategias de vacuna que antes no eran viables desde un punto de vista de escala ahora sí lo son. El rendimiento que se puede lograr usando los presentes métodos, descritos en la presente memoria y en las solicitudes provisionales referenciadas, en teoría, permite la producción de ARPs que expresan el rango completo de antígenos expresados por el tumor, célula tumoral, patógeno o parásito a partir del cual se preparó el ácido nucleico insertado en el ácido nucleico de replicón vírico.

Una de estas estrategias es una "vacuna específica de paciente" en la que se prepara una única preparación de vacuna en una base de paciente-a-paciente para el tratamiento profiláctico o terapéutico de enfermedades infecciosas o una afección neoplásica, p.ej., cáncer. Puesto que se estima que una única célula tumoral expresa hasta 5.000 genes, cualquier intento de generar una vacuna de biblioteca de tumor de replicón alfaviral que exprese un número tan grande genes usando estrategias tradicionales estaría limitado significativamente en el número de replicones que expresan cada gen. Además, las partículas requerirían de una purificación para ser adecuadas para formulación y administración en un formato clínico, y la purificación a menudo da como resultado una pérdida significativa adicional de título. Usando las técnicas de producción de ARP mejoradas, ahora podemos generar una población de replicones en la que la mayoría, si no todos, de los genes procedentes de la célula tumoral probablemente están representados, de media, al menos una vez en una población de 1×10^5 partículas. Además de los elevados rendimientos de esta estrategia, el proceso puede proporcionar una formulación más pura en términos de unidades infecciosas. Esto significa que no las etapas de purificación secuencial pueden no ser necesarias, evitando de este modo posteriores pérdidas en el proceso. Adicionalmente, el aumento de pureza puede rebajar el riesgo de provocar respuestas inmunes anti-vector y anti-contaminante en el hospedante. Normalmente, dichas respuestas potencialmente podrían evitar o comprometer la eficacia de vacunaciones de recuerdo. Para las estrategias de tipo tratamiento tumoral terapéutico, la capacidad de administrar elevados títulos de vacuna en una formulación pura en intervalos frecuentes es una característica deseable clave en una vacuna. La presente invención permite una nueva estrategia de biblioteca multi-antigénica a realizar usando vectores de replicón de virus VEE. Dichas bibliotecas pueden codificar antígenos múltiples, o repertorios génicos completos de organismos patogénicos, parásitos o células tumorales.

Mientras que los métodos de la técnica anterior usados para producir ácidos nucleicos para la introducción en células para la producción de ARP son caros y laboriosos, la presente descripción describe la modificación de varios parámetros para alcanzar un rendimiento de ARP mejorado a la vez que se simplifica el proceso y se reducen los costes por ARP en órdenes de magnitud. El rendimiento mejorado de partículas de alfavirus ha permitido la clonación de ácidos nucleicos derivados de una célula tumoral, patógeno o parásito en un ácido nucleico de replicón de alfavirus y el empaquetamiento con suficiente eficiencia, de tal modo que se produce un conjunto representativo de antígenos de la célula tumoral, patógeno o parásito mediante la "biblioteca de expresión" de ARP. El rendimiento de ARP también es suficientemente alto para que un paciente humano o animal pueda ser inoculado con una alícuota de dicha preparación de ARP, conteniendo además la preparación de forma opcional un adyuvante inmunológico, de tal modo que se generan respuestas inmunes a una multiplicidad de determinantes antigénicos codificados en la biblioteca de ARP, y la preparación es administrada al paciente.

La Tabla 1 muestra la valoración de ARP multi-antigénicos producidos a partir de un conjunto de ADNc. Las construcciones de replicón de alfavirus que expresan 10 genes heterólogos diferentes (cloramfenicol acetiltransferasa (CAT), beta-galactosidasa (β -gal), oncogén Rat/Neu, luciferasa, VIH Gag, antígeno A de cáncer, y cuatro antígenos de malaria: PkMSP1-42, PyHep17, PfAMA1 y PkCSP) fueron linealizadas con endonucleasa de restricción Not1, se agruparon y se generaron transcritos de ARN usando ARN polimerasa T7. El conjunto de moléculas de ARN fue co-electroporado en células VERO con cápsida alfaviral y ARNs colaboradores de glicoproteína para producir una población de ARP que consiste en ARP individuales que expresan los 10 antígenos

diferentes determinados mediante valoración de ARP usando ensayos de inmunofluorescencia específicos de cada producto génico.

La Tabla 2 muestra la valoración de ARP multi-antigénicos producidos a partir de un conjunto de ARNs. Las construcciones de replicón de alfavirus que expresan 7 genes heterólogos diferentes (CMV IE1, CMV gB, HA gripe, VIH Pol, VIH Gag, Rat/neu, CAT) fueron linealizadas individualmente con endonucleasa de restricción Not1. Los transcritos de ARN de cada replicón fueron generados usando ARN polimerasa T7. Los siete productos de transcripción de ARN diferentes fueron mezclados en concentraciones equivalentes y fueron co-electroporados en células VERO con cápsida alfaviral y ARNs colaboradores de glicoproteína. Se produjo una población de ARP que expresaban los 7 antígenos diferentes determinados mediante valoración de ARP usando ensayos de inmunofluorescencia específicos para cada producto génico.

La Tabla 3 proporciona un resumen de respuestas inmunes específicas de antígeno en animales vacunados con ARP multi-antigénico (tal como se muestra en la Figura 1). Las respuestas inmunes específicas de antígeno en forma de inmunidad humoral se miden mediante ELISA y se presentan como título medio geométrico recíproco, o mediante ensayo de transferencia Western blot o IFA y se presentan como la dilución más baja a la que la señal específica de antígeno era detectable. Las respuestas inmunes específicas de antígeno en forma de inmunidad celular se miden mediante detección ELISPOT de células secretoras de IFN- γ y se presentan como linfocitos secretores de IFN- γ y específicos de antígeno por cada 10^6 linfocitos. Los animales que recibieron la preparación ARP multi-antigénica por ruta s.c. ó i.p. de inoculación montaron respuestas inmunes frente a todos los antígenos de la preparación. Como control positivo, un grupo recibió ARP de VIH-Gag y montó respuestas inmunes específicas solo de Gag. Los animales de control negativo no presentaron respuestas detectables a ningún antígeno. Muchas muestras no fueron valoradas hasta el punto final, y se presentan como títulos iguales o superiores al valor dado. Cabe destacar que la respuesta inmune provocada por la proteína de gen Gag de VIH como parte de las preparaciones multiantigénicas fue equivalente en términos humorales y celulares a la proteína Gag de VIH administrada como una única (homogénea) preparación estándar. Esto demuestra que las secuencias codificadoras expresadas como componente de una biblioteca de expresión más grande todavía pueden ser efectivamente inmunogénicas empleando los métodos de esta invención.

Las preparaciones de ARP inmunológicas que comprenden secuencias de nucleótidos expresables que codifican una multiplicidad de determinantes antigénicos de células tumorales, patógenos o parásitos pueden administrarse como parte de un régimen profiláctico, es decir, para reducir la probabilidad de que el humano o animal al cual se administra la preparación padezca la afección neoplásica, la infección de patógeno o la infección parasitaria, o como régimen terapéutico, para aliviar la gravedad de cualquier condición asociada a una afección neoplásica, infección de patógeno o infección parasitaria existentes, o de tal modo que la afección neoplásica, infección de patógeno o infección parasitaria sea prevenida debido a una respuesta inmune generada en el humano o animal al cual se ha administrado la preparación.

Aunque la generación de una respuesta inmune incluye al menos algún nivel de inmunidad protectora dirigida a la célula tumoral (o afección neoplásica), patógeno o parásito, el resultado clínico en el paciente que padece dicha afección neoplásica o infección con un parásito o un patógeno puede mejorar tratando también al paciente con un agente quimioterapéutico adecuado, tal como es conocido en la técnica. Cuando el patógeno es vírico, se puede administrar un compuesto antivírico tal como Aciclovir de forma concomitante con la vacunación de ARP, por ejemplo, en pacientes con infección de herpesvirus, o HAART (terapia anti-retroviral altamente activa) en individuos infectados con VIH. Cuando el patógeno es un patógeno bacteriano, de forma deseable se administra un antibiótico frente al cual la bacteria es susceptible y cuando el patógeno es un hongo de forma deseable se administra un antibiótico antifúngico adecuado. De forma similar, se conocen agentes químicos para el control y/o la erradicación de infecciones parasitarias y se administran de forma ventajosa a pacientes humanos o animales usando dosis y calendarios de dosificación bien conocidos en la técnica. Cuando el paciente padece una afección neoplásica, por ejemplo, un cáncer, la administración de la composición inmunogénica que comprende las ARPs capaces de expresar una multiplicidad de antígenos asociados a cáncer en el paciente al cual se ha administrado de forma deseable viene acompañada de la administración de agente(s) antineoplásico(s), que incluyen, aunque sin limitación, agentes quimioterapéuticos tales como daunorrubicina, taxol, tiorueas, anticuerpos específicos de cáncer ligados a radionucleidos terapéuticos, siempre que el(los) agente(s) no impida(n) la capacidad del paciente de generar una respuesta inmune a los ARPs administrados y a los antígenos cuya expresión dirigen en el paciente.

Las formulaciones farmacéuticas, tales como vacunas u otras composiciones inmunogénicas, pueden comprender una cantidad inmunogénica de las partículas de replicón de alfavirus infecciosas con defecto de propagación en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad inmunogénica" es una cantidad de las partículas de alfavirus infecciosas que es suficiente para evocar una respuesta inmune en el sujeto al cual se administra la formulación farmacéutica. Se cree que una cantidad de entre aproximadamente 10^1 y aproximadamente 10^{10} unidades infecciosas por dosis, preferiblemente de 10^5 a 10^8 , es adecuada, dependiendo de la edad y de la especie del sujeto que vaya a ser tratado. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque sin limitación, agua estéril libre de pirógenos y disolución salina fisiológica libre de pirógenos. Los sujetos a los que pueden administrarse cantidades inmunogénicas de las partículas de alfavirus infecciosas con defecto de propagación descritas en la presente memoria incluyen, aunque sin limitación, sujetos humanos y animales (p.ej., perro, gato, caballo, cerdo, vaca, cabra, conejo, burro, ratón, hámster, mono). También se pueden

añadir compuestos inmunológicamente activos tales como citocinas y/o BCG para aumentar la respuesta inmune a la preparación de partículas de replicón vírico administrada. La administración puede ser a través de cualquier ruta adecuada, tal como administración intratumoral, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, intranasal, intravaginal, intrarrectal, subcutánea o intravenosa.

- 5 Las composiciones inmunogénicas que comprenden los ARPs (que dirigen la expresión de los antígenos de interés cuando se administran las composiciones a un humano o animal) producidas usando los métodos descritos en la presente memoria pueden formularse mediante cualquier medio conocido en la técnica. Dichas composiciones, especialmente vacunas, se preparan típicamente como inyectables, como disoluciones líquidas o como suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas, por ejemplo, preparaciones liofilizadas, adecuadas para
10 disolución o suspensión en líquido antes de la inyección.

Los ingredientes inmunogénicos activos (los ARPs) a menudo se mezcla con excipientes o vehículos que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados incluyen, aunque sin limitación, agua esterilizada, salino, dextrosa, glicerol, etanol, o similares, y combinaciones de los mismos.

- 15 Adicionalmente, si se desea, las vacunas pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH, y/o adyuvantes que potencien la eficacia de la vacuna. Los ejemplos de adyuvantes que pueden ser efectivos incluyen, aunque sin limitación: hidróxido de aluminio; N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP); N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado nor-MDP); N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-
20 hidroxifosforilo)-etilamina (CGP 19835A, denominado MTP-PE); y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de pared celular (MPL+TDM+CWS) en una emulsión de escualeno al 2%/Tween 80. La efectividad de un adyuvante puede determinarse midiendo la cantidad de anticuerpos dirigidos contra el producto inmunogénico del ARP resultante de la administración del inmunógeno en vacunas que también constan de los diversos adyuvantes. También se pueden usar formulaciones y modos de administración adicionales, tal como se conocen en la técnica.

- 25 Se pueden incorporar una o más moléculas inmuno-potenciadoras, tales como quimiocinas y/o citocinas, en la composición inmunogénica administrada al paciente o animal. Alternativamente, se pueden incorporar vectores de replicón de alfavirus que contengan la(s) secuencia(s) codificadora(s) para la molécula inmuno-potenciadora en la composición inmunogénica. Se entiende que la elección de la quimiocina y/o la citocina puede variar según el tejido o célula neoplásicos, el parásito o el patógeno contra los cuales se desea una respuesta inmune. Los ejemplos
30 pueden incluir, aunque sin limitación, interleucina-4, interleucina-12, gamma-interferón, factor estimulante de colonia de granulocito macrófago y ligando FLT-3.

- Las composiciones inmunogénicas (o biológicamente activas de otro modo) que contienen ARP son administradas de una forma compatible con la formulación de dosis, y una cantidad tal que sea profiláctica y/o terapéuticamente efectiva. La cantidad a administrar, que generalmente se encuentra en el rango de aproximadamente 10^1 a
35 aproximadamente 10^{10} unidades infecciosas, preferiblemente de 10^5 a 10^8 , en una dosis, depende del sujeto a tratar, de la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, y del grado de protección deseada. Las cantidades precisas del ingrediente activo requeridas para la administración pueden depender del juicio del médico, veterinario o personal sanitario responsable, y pueden ser peculiares para cada individuo, aunque dicha determinación forma parte de las habilidades de dichos profesionales.

- 40 La vacuna u otra composición inmunogénica puede administrarse en una dosis individual o en un calendario de dosis múltiples. Un calendario de dosis múltiples es aquel en el que un curso primario de vacunación puede incluir de 1 a 10 o más dosis separadas, seguidas de otras dosis administradas a intervalos de tiempo posteriores según sea requerido para mantener y/o reforzar la respuesta inmune, p.ej., semanalmente, mensualmente o de 1 a 4 meses para una segunda dosis, y si es necesario, una(s) dosis posterior(es) tras varios meses o años.

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

Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la invención según se reivindica en la presente memoria. Se pretende que cualquier variación en los artículos de los ejemplos que imaginen los especialistas esté dentro del alcance de la presente invención según se define en las reivindicaciones anexas a esta descripción.

5 Ejemplos

Ejemplo 1. Generación de vectores de replicón de alfavirus que expresan una biblioteca de antígenos asociados a tumor.

Las células tumorales se obtienen típicamente de un paciente con cáncer mediante resección, biopsia o muestreo endoscópico; las células puede usarse directamente, almacenarse congeladas o mantenerse o expandirse en cultivo. El ARN es extraído de las células tumorales usando métodos estándar conocidos en la técnica, p.ej., usando reactivos y kits disponibles comercialmente tales como Trizol (Sigma, St. Louis, MO) o el kit de aislamiento de ARN total S.N.A.P. (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), seguido de purificación de ARNm en oligo (dT)-Sepharose. El ARNm puede enriquecerse adicionalmente en secuencias específicas de tumor mediante hibridación sustractiva o mediante otro método conocido en la técnica. Se sintetiza ADNc de primera cadena usando oligonucleótidos oligo (dT) con un sitio de restricción raro en el extremo 5'. Tras purificación de ADNc, se produce la segunda cadena usando cualquiera de los métodos estándar, p.ej., usando ADN polimerasa I-RNasaH o amplificación no específica. A continuación se liga un adaptador para crear un extremo cohesivo, y se digiere ADN de cadena doble con una endonucleasa de restricción reconocida pocas veces (tal como Dral) en un sitio que ha sido incorporado en el cebador oligo (dT). Este procedimiento crea un ADNc de cadena doble con extremos cohesivos no compatibles adecuado para clonación direccional.

Alternativamente, se puede usar una estrategia descrita en el Ejemplo 2 (más adelante) para la generación de extremos cohesivos para la clonación direccional. En una realización adicional, los extremos cohesivos se pueden unir mediante desoxirribonucleótido transferasa. A continuación se clona el ADNc de doble cadena en un vector de replicón de plásmido o se usa para construir moléculas de replicón recombinantes *in vitro* de un modo similar al descrito más adelante. Esta estrategia produce moléculas de replicón recombinante que contienen una marca de biotina en los extremos 3' y un promotor T7 en los extremos 5', permitiendo de este modo la selección de las moléculas recombinantes y la generación de ARN *in vitro* usando ARN polimerasa dependiente de ADN T7. Se pueden implementar etapas selectivas adicionales para "reducir por selección" el número de antígenos presentes en la biblioteca de antígenos tumorales. Métodos tales como la hibridación sustractiva y el análisis diferencial son bien conocidos en la técnica (véanse las Patentes de EE.UU. nº 5.958.738, 5.827.658 y 5.726.022 y el documento US2002018766), y se puede implementar un método de selección como éste inmediatamente antes de la clonación en la construcción de replicón de VEE. Esta estrategia sirve para limitar el conjunto de antígenos tumorales a genes expresados exclusivamente o regulados al alza preferencialmente en una célula tumoral. Esta selección sirve para reducir o eliminar la frecuencia y/o la presencia de genes celulares normales en la biblioteca de antígenos. Sin pretender establecer ninguna teoría particular, se cree que los beneficios adicionales incluyen la eliminación de antígenos no específicos de tumor, enfocando la respuesta inmune contra antígenos asociados a tumores, maximizando de este modo la especificidad potencial de la preparación de vacuna y reduciendo el riesgo de inducir respuestas autoinmunes. Esta "reducción por selección" del repertorio de antígenos también es relevante para estrategias de imprimación-recuerdo. En muchos casos, puede ser ventajoso vacunar con un amplio catálogo de antígenos tumorales, y en las posteriores inoculaciones de recuerdo limitar/reducir por selección el número de antígenos de tal modo que el enfoque el sistema inmune de forma efectiva sobre los antígenos específicos. Esto puede realizarse fácilmente realizando una reducción por selección de antígenos basada también en la identificación de a qué antígenos ha respondido el hospedante después de la primera inmunización, y básicamente diseñando a media de este modo cada recuerdo posterior para aumentar la respuesta inmune frente a los antígenos que el hospedante ha demostrado que puede reconocer y para los cuales se ha generado una respuesta inmune.

Ejemplo 2. Generación de vectores de replicón de alfavirus que expresan ADNcs específicos de organismos de enfermedad infecciosas a partir de una muestra de tejido o sangre infectados cuando se conocen las secuencias génicas diana.

Este ejemplo describe la clonación de un repertorio de genes víricos/bacterianos/parasitarios específicos de un individuo con una infección aguda o crónica en casos en los que el gen o genes de interés (es decir, los genes que codifican los restos inmunogénicos que van a ser expresados por los replicones) son adquiridos a partir de un agente de secuencia conocida. Se aísla un ARNm a partir de una muestra de tejido o de sangre siguiendo métodos estandarizados conocidos en la técnica, p.ej., el kit de aislamiento de ARN total S.N.A.P. (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA). Se sintetiza ADNc de primera cadena mediante cualquier método estándar conocido en la técnica, p.ej., con el kit de ciclo de ADNc (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA), o usando una transcriptasa inversa AMV y cebadores aleatorios. El(los) gen(es) de interés es(son) amplificado(s) a partir de ADNc usando cebadores específicos de gen diana, seguido de la purificación del amplicón usando un kit de purificación de PCR (Qiagen Inc., Valencia, CA) o cualquier otro método conocido en la técnica. Este amplicón se puede clonar en el replicón de VEE usando métodos conocidos por los especialistas en la técnica, p.ej., usando clonación G:C, clonación direccional tras digestión de endonucleasa de restricción o métodos de recombinación *in vitro* tales como Gateway (Invitrogen, Carlsbad, CA) o el sistema de recombinación Cre-lox.

En una realización preferida, la(s) secuencia(s) codificadora(s) de interés son amplificadas usando oligonucleótidos híbridos de ARN/ADN. Tras la amplificación, el amplicón de ADN es tratado con NaOH para digerir la porción de ARN de los cebadores, o alternativamente, se incubaba a 50°C en presencia de metales de tierras raras para hidrolizar selectivamente el enlace fosfodiéster entre el desoxirribonucleótido y el ribonucleótido (Chen et al., 2000, Biotechniques; 28(3): 498-500, 504-5 y Chen et al., 2002, Biotechniques, 32: 516, 518-20) con el objetivo de crear un saliente en 3' requerido para la ligación. Se crea un saliente en 3' complementario en las secuencias del vector de forma similar o usando una endonucleasa de restricción. De este modo, se preparan los dos fragmentos de la molécula de replicón: el brazo izquierdo y el brazo derecho. El brazo izquierdo incluye un promotor T7 ligado operativamente a secuencias específicas de VEE, hasta el sitio de clonación conveniente, incluyéndolo. El brazo derecho contiene la región 3' no traducida del VEE. El brazo derecho también contiene una marca de biotina en el extremo 3'. El fragmento amplificado con un saliente en 3' se une a los brazos izquierdo y derecho del vector usando una ADN ligasa T4. La molécula construida es separada de la mezcla de reacción de ligación usando partículas magnéticas recubiertas de estreptavidina, o cualquier otra técnica de absorción en fase sólida similar. Se produce ARN de replicón de longitud completa a partir de ADN de vector recombinante mediante transcripción *in vitro* usando ARN polimerasa dependiente de ADN T7. Esta etapa da como resultado la producción solo de moléculas recombinantes de longitud completa, ya que las moléculas incompletas no se unen a estreptavidina, o no son transcritas debido a la carencia de secuencias de promotor T7. Las moléculas resultantes de ARN de replicón recombinante codifican un repertorio completo de gen(es) diana, que representa el genotipo de la diana que es infecciosa en el paciente. Una ventaja de este método es la capacidad de tener una representación de todas las variantes para una población génica particular procedente de un individuo, p.ej., la amplificación de la secuencia de gen gp160 de envoltura de VIH-1 aislada de un paciente infectado con VIH usando los métodos descritos anteriormente genera una población de ARP que codifica la mayoría de las variantes de envoltura, o todas, de un paciente concreto. Si el paciente está infectado con múltiples cepas del virus o con variantes distintas que proceden de una cepa en circulación parental original, la anterior técnica captura todas las variantes y están representadas en la población de la vacuna de ARP final.

Ejemplo 3. Generación de vectores de replicón de alfavirus que expresan ADNc específico de enfermedad infecciosa procedente de una muestra de tejido/sangre infectada cuando se desconocen las secuencias de gen diana.

Este ejemplo describe la clonación de un repertorio de genes víricos/bacterianos/parasitarios en casos en los que no se conoce la secuencia del gen o genes de interés. Se aísla ARNm vírico, bacteriano o parasitario a partir de una muestra de campo o de un cultivo de reserva o de una preparación purificada usando el kit MICROBExpress (Ambion, Austin, TX) o mediante cualquier otro método conocido por los especialistas en la técnica. Se sintetiza la primera cadena de ADNc usando cebadores aleatorios, o cebadores aleatorios con un sitio de restricción inusual en el extremo 5', seguido de la síntesis de la segunda cadena de ADNc con ADN polimerasa I y ARNasa H usando métodos estándar conocidos por el especialista en la técnica. Posteriormente el ADNc de cadena doble es clonado en un vector de VEE tras ligación de una secuencia adaptadora o de ligando como se indica a continuación. En los casos en los que se sintetiza el ADNc con un cebador aleatorio que contiene un sitio de restricción inusual, se usa un ligando para unir un segundo sitio de restricción inusual diferente en el extremo 5' del ADNc de cadena doble. La digestión del conjunto de ADNc con estas dos endonucleasas de restricción da como resultado la generación de fragmentos de ADNc con diferentes extremos cohesivos, lo que facilita la clonación direccional en el vector de replicón usando métodos conocidos en la técnica. En el caso de que el ADNc sea generado con un cebador aleatorio que carece de un sitio de restricción único adicional, el ADNc de cadena doble se metila usando metilasa EcoRI para proteger secuencias internas frente a la digestión con endonucleasa de restricción EcoRI. El ligando EcoRI se une a continuación usando ADN ligasa T4, seguida de digestión con endonucleasa de restricción EcoRI. Esto produce un fragmento de ADNc con extremos cohesivos, que puede ser clonado en un replicón. Se puede usar una estrategia de clonación similar a la descrita en el Ejemplo 2 para la generación de un conjunto de moléculas de replicón marcadas con biotina en el extremo 3' y que contienen un promotor de ARN polimerasa dependiente de ADN T7 en el extremo 5'. Nuevamente, como se ha descrito en los ejemplos previos, se puede usar una hibridación sustractiva o una presentación diferencial como etapas de escrutinio posteriores adicionales para seleccionar positiva o negativamente genes/secuencias específicos de patógeno de un modo similar al descrito para las estrategias específicas de tumor. Nuevamente, esto se puede realizar con todas las vacunaciones o en "tiempo real", donde el hospedante es monitorizado durante las vacunaciones y la vacuna se diseña a medida para contener antígenos frente a los cuales el hospedante demuestra reconocimiento y respuesta.

Ejemplo 4. Empaquetamiento de ARP multi-antigénico.

Se llevó a cabo la generación de una población de ARPs en la que cada ARP expresa un antígeno o antígenos diferentes a partir de un único evento de electroporación de dos formas alternativas. El primer método consistió en combinar 0,5 µg de ADN de 10 construcciones de vector de replicón diferentes, cada una conteniendo una única secuencia codificadora heteróloga (Tabla 1). Los ADNs fueron linealizados con enzima de restricción NotI, y el ARN se transcribió a partir del conjunto de ADN de replicón con ARN polimerasa T7. A continuación se purificó la reacción de transcripción de ARN de replicón múltiple usando una columna RNEasy (Qiagen Inc., Valencia, CA). Se produjeron ARPs mediante electroporación usando 30 µg de ARN de replicón múltiple combinados con 30 µg de cada uno de ARN colaborador de cápsida purificada (C) y ARN colaborador de glicoproteína (GP) en $1,0 \times 10^8$ células Vero en una cubeta de 0,8 mL de volumen. Tras la electroporación, las células fueron suspendidas en 200 mL de medio Opti-pro (Invitrogen, Carlsbad, CA) y sembradas en 4 matraces de cultivo de 175 cm².

Aproximadamente 26 h después de la electroporación, el medio de cada matraz fue descartado y reemplazado con 5 mL de una disolución de lavado con sal (NaCl 1 M en tampón de fosfato 20 mM (pH 7,3)). Los matraces fueron incubados a temperatura ambiente durante 10 minutos, el lavado de sal se recolectó y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 micrómetros. Se determinó el título de ARP individual en células Vero usando anticuerpos específicos de antígeno mediante métodos de inmunofluorescencia estándares. En la Tabla 1 se muestra el título de cada ARP en el conjunto producido a partir de una única electroporación. El título de la preparación de ARP fue de $4,1 \times 10^9$ unidades infecciosas por mL, dando como resultado un total de $8,2 \times 10^{10}$ i.u. de ARP total generado a partir de una única cubeta de electroporación. En la población de ARP había presentes representantes de los 10 antígenos. Este ejemplo demuestra que no solo se pueden expresar antígenos diferentes múltiples a partir de una única preparación de ARP, sino que el rango de tipo de antígeno puede ser extremadamente variado. En esta preparación, los antígenos fueron derivados de un origen de enfermedad infecciosa vírica (VIH), de origen parasitario (malaria) o de origen canceroso (rat/Neu y antígeno A de cáncer) así como de enzimas (CAT, luciferasa y β -gal).

El segundo método consistió en la generación de transcritos de ARN para cada vector de replicación, independientemente más que en conjunto. Los 7 vectores de replicación usados en este experimento se enumeran en la Tabla 2. Se combinaron 10 μ g de ARN de cada replicación purificado con 30 μ g de cada uno de ARN de colaborador-C purificado y ARN de colaborador-GP, para un total de 130 μ g de ARN. La mezcla de ARN se electroporó a continuación en $1,0 \times 10^8$ células Vero. Las células electroporadas se suspendieron en 200 mL de medio Opti-pro y se sembraron en 2 matraces de cultivo de 300 cm². Aproximadamente 24 h después de la electroporación se recolectaron los medios de cada matraz y se reemplazaron con 10 mL de lavado de sal (NaCl 1 M en tampón fosfato 20 mM, pH 7,3). Los matraces fueron incubados a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se recolectó el lavado con sal. Tanto el medio como el material de lavado con sal fueron filtrados a través de un filtro de jeringa de 0,2 micrómetros. Se valoraron los ARP individuales en el medio y en el lavado con sal en células Vero usando anticuerpos específicos de antígeno para IFA. En la Tabla 2 se muestra el título de cada ARP encontrado en el medio y en el lavado con sal. El título del ARP recuperado en el medio fue de $5,3 \times 10^7$ i.u./mL dando como resultado $1,1 \times 10^{10}$ i.u. de ARP total generado ($5,3 \times 10^7$ i.u./mL \times 200 mL = $1,1 \times 10^{10}$ i.u.). El título del ARP recuperado en el lavado con sal fue de $4,05 \times 10^9$ i.u./mL dando como resultado $8,1 \times 10^{10}$ i.u. de ARP total generado por cubeta de electroporación individual. El material del lavado con sal y el medio se combinaron para un total de $9,2 \times 10^{10}$ i.u. de ARP. En la población de ARP había presentes representantes de los 7 antígenos. Los ARP agrupados fueron purificados a continuación en una columna HiTrap Heparin HP de 5 mL (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia) para uso en estudios de vacunación de animales.

Todas las preparaciones de ARP fueron evaluadas mediante ensayos de seguridad estándares para confirmar la ausencia de virus competente de replicación (RCV). Resumidamente, se inocularon 1×10^9 i.u. de cada preparación en monocapas de células VERO con un m.o.i. de menos de 1 en 1 hora. Se aplicó medio de cultivo a las monocapas de células después de un periodo de infección de 1 hora y las células se cultivaron durante 24 horas. Tras 24 horas se recolectó todo el sobrenadante, se clarificó y aplicó a monocapas de células VERO nuevas durante otras 48 horas. Las monocapas de células fueron monitorizadas para determinar la presencia de cualquier efecto citopático (CPE) indicativo de la presencia de partículas de virus competente de replicación contaminantes. En ninguno de los casos se detectó RCV en las preparaciones de vacuna de ARP multi-antigénicas.

Ejemplo 5. Estudios en animales con partículas de virus multi-antigénicas.

Se obtuvieron ratones BALB/c de cinco a seis semanas de edad de Charles River Laboratories y se aclimataron una semana antes de cualquier procedimiento. Se suministró agua *ad libitum* a los ratones (ósmosis inversa, 1 ppm de Cl) y una dieta de roedor irradiada estándar (NIH31 modificada e irradiada) que consistió en un 18% de proteína, un 5% de grasa y un 5% de fibra. Los ratones fueron alojados en microaislantes estáticos con un ciclo de luz de 12 horas a 21 – 22 °C (70 – 72 °F) y con un 40% - 60% de humedad. Todos los estudios con animales cumplieron con las recomendaciones de la "Guide for Care and Use of Laboratory Animals" con respecto a restricciones, cría de animales, procedimientos quirúrgicos, regulación de piensos y fluidos, y cuidados veterinarios. El cuidado de los animales y el programa de uso de animales están acreditados por AAALAC.

Para las inyecciones primarias y de recuerdo, se inocularon grupos de ratones en ambas almohadillas plantares traseras con anestesia de isoflorano con ARP multi-antigénico en diluyente (PBS con un 1% v/v de albúmina de suero humano y un 5% p/v de sacarosa). Se realizaron inyecciones subcutáneas (s.c.) en la almohadilla con una aguja 30.5G y una jeringa Hamilton de 0,10 mL inyectando 20 μ L en cada almohadilla. Los animales fueron inoculados en los días 1, 23 y 44. Se obtuvieron muestras de suero mediante sangrado retro-orbital con anestesia de isoflorano antes de la primera inoculación en los días -7 y 0 (pre-sangrado), en los días 30 y 35 (después de la inoculación primaria) y en los días 51 y 56 (7 y 12 días después del recuerdo). Se extrajeron los bazo al menos 7 días después del recuerdo para ensayos ELISPOT de IFN- γ .

Se usó el ensayo de inmunofluorescencia (IFA) de células Vero infectadas con ARP para medir la potencia o el título infeccioso de cada una de las preparaciones de vacuna. Todas las vacunas de ARP fueron valoradas antes de las inoculaciones. En el día de cada inyección los inóculos residuales fueron retro-valorados. Los inóculos de vacuna de ARP se mantuvieron a 4°C durante el tiempo posterior a la vacunación para mantener el título. Los grupos de ensayo incluyeron las siguientes preparaciones de vacuna: preparaciones de ARP multi-antigénicas de alta dosis y de baja dosis administradas en dosis de 1×10^8 ó 1×10^6 i.u., respectivamente. Como control para la monitorización de

la respuesta inmune en comparación con una única preparación de ARP que expresa un único antígeno de ARP, que expresa solo Gag de VIH fueron administrados en una dosis equivalente al número de ARP de VIH-Gag en la mezcla multi-antigénica. Los animales de control negativo fueron sham inmunizados solo con diluyente.

Ejemplo 6. Medida de respuestas inmunes humorales y celulares tras administración de ARP multi-antigénico.

- 5 Detección de anticuerpos específicos de Gag de VIH mediante ELISA. Como recubrimiento de antígeno se usó el elemento aislado recombinante (his)-p55 de VIH-1 subtipo C DU-422, marcado con histidina. Resumidamente, se transfectaron células BHK con ARN de replicón de VEE que expresa his-p55 y se prepararon lisatos de Triton-X 100. La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad de metales, según las recomendaciones de los suministradores.
- 10 Los sueros del Día 51 (7 días después del recuerdo) fueron evaluados para determinar la presencia de anticuerpos específicos de Gag mediante un ELISA indirecto estándar. Para la detección de la Ig total específica de Gag, se usó un anticuerpo policlonal secundario que detecta IgM, IgG e IgA para la determinación de punto final de la valoración. Resumidamente, placas ELISA Maxisorp de 96 pocillos (placas multipocillo de poliestireno con superficie modificada para aumentar la afinidad hacia moléculas polares, es decir, los anticuerpos; Nunc, Naperville, IL) fueron recubiertas con 50 µL de tampón de carbonato de sodio 0,05 M, pH 9,6 (Sigma, St. Louis, MO) que contenía 40-80 ng de his-p55 por pocillo. Las placas fueron recubiertas con plástico adhesivo e incubadas durante una noche a 4°C. Al siguiente día, se descartó el antígeno no ligado y las placas fueron incubadas durante 1 hora con 200 µL de tampón de bloqueo (PBS que contenía un 3% p/v de BSA) a temperatura ambiente. Los pocillos fueron lavados 6 veces con PBS y se añadió a los pocillos recubiertos con antígeno 50 µL/pocillo de suero de ensayo, diluido en serie a la mitad en tampón (PBS con 1% p/v de BSA y 0,05% v/v de Tween 20). Se incluyó anticuerpo monoclonal anti-p24 de ratón (Zeptomatrix, Buffalo, NY) en todos los ensayos como control positivo. Los controles negativos de cada ensayo incluyeron blancos (pocillos con todos los reactivos y tratamientos excepto el suero) y sueros pre-sangrados. Las placas fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente, y a continuación se lavaron 6 veces con PBS. A cada pocillo se añadieron 50 µL de anticuerpo secundario poli-isotipo anti-ratón de cabra conjugado a fosfatasa alcalina (AP) (Sigma) diluido hasta una concentración predeterminada en tampón diluyente, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos fueron lavados 6 veces con PBS antes de la adición de 100 µL de sustrato de p-nitrofenil fosfato (pNPP) (Sigma). El título ELISA de anticuerpos en suero se definió como la inversa de la dilución de suero más alta que da lugar a una densidad óptica a 405 nm superior o igual a 0,2 por encima del fondo (pocillos del blanco). Las respuestas (inmunes) de anticuerpo positivas fueron detectadas en ratones vacunados con la preparación de ARP multi-antigénica y en ratones que recibieron el ARP VIH-Gag.

- Las células secretoras de interferón gamma (IFN-γ) específicas de antígeno Gag y Pol son detectadas mediante Ensayo IFN-γ ELISPOT. Se prepararon suspensiones de célula individual de linfocitos esplénicos de ratones BALB/c inmunizados con ARP mediante disrupción física de la cápsula esplénica en medio R-10 (medio RPMI 1640 suplementado con 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, MEM 0,1 mM de disolución de aminoácidos no esenciales, HEPES 0,01 M, glutamina 2 mM y un 10% de suero de ternero fetal inactivado térmicamente). Los linfocitos fueron aislados mediante centrifugación de gradiente de densidad Lympholyte M (Accurate Scientific, Westbury, NY), se lavaron dos veces y se resuspendieron en medio R-10 fresco. Se evaluaron las poblaciones de linfocitos esplénicos totales no separadas.

- Se usó un kit IFN-γ ELISPOT (Monoclonal Antibody Technology, Nacka, Suecia) para llevar a cabo el ensayo. Las células viables fueron sembradas en pocillos ELISPOT individuales en una placa ELISPOT Multiscreen Immobilon-P (placa de filtración de 96 pocillos certificada ELISPOT con membranas de PVDF de alta unión a proteína; Millipore, Billerica, MA) que habían sido precubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ, e incubadas durante 16-20 horas. Las células fueron eliminadas mediante múltiples lavados con tampón y los pocillos fueron incubados con un anticuerpo monoclonal anti-IFN-γ biotinilado, seguido de lavado e incubación con Complejo de Avidina-Peroxidasa (Kit Vectastain ABC Peroxidase, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Después de la incubación, los pocillos fueron lavados e incubados durante 4 minutos a temperatura ambiente con sustrato (comprimidos de Complejo de Avidina-Peroxidasa, Sigma, St. Louis, MO) para facilitar la formación de puntos, que representan las posiciones de las células individuales secretoras de IFN-γ durante el cultivo. Las placas fueron enumeradas mediante análisis automatizado con un sistema Zeiss KS ELISPOT.

- 50 Para enumerar las células secretoras de IFN-γ específicas de Gag en linfocitos de ratones inmunizados con construcciones VIH GAG ARP y VIH ARP multi-antigénicas que expresan *gag*, los linfocitos fueron estimulados con el péptido inmunodominante de VIH-Gag restringido con CD8 H-2K^d, o con un conjunto irrelevante de péptidos Nef (péptido Nef que contiene 10 elementos de 15 unidades que solapan con 11 preparados a partir de cepa DU₁₅₁ de VIH de subtipo C), durante 16-20 horas (5% de CO₂ a 37°C). El péptido Gag fue evaluado a 10 µg/mL y el control Nef fue evaluado a 20 µg/mL. Las células menos el péptido sirven como control de fondo. Como control positivo, las células fueron estimuladas con 4 µg/mL de concanavalina A durante un periodo de tiempo similar. Los péptidos fueron sintetizados y purificados hasta >90% (New England Peptide, Gardner, MA).

- 60 Para enumerar las células secretoras de IFN-γ específicas de Pol en linfocitos de ratones inmunizados con construcciones de ARP multi-antigénicas que expresan *pol*, se usó el anterior protocolo con las siguientes modificaciones. Recientemente se han identificado epítomos Pol de VIH-1 para células T CD8 y CD4 en el fondo de

H-2^d (Casimiro et al., J. Virology 76: 185, 2002). Se estimularon poblaciones de células con un conjunto de 3 péptidos que contenían epítipo Pol y con un conjunto de péptido de antígeno irrelevante como control negativo (conjunto nef 1). Se seleccionaron los tres péptidos mostrados a continuación después de una búsqueda bibliográfica para identificar los epítipos Pol CTL murinos conocidos.

- 5 VYYDPSKDLIA (SEQ ID NO: 1) (Casimiro et al, J. Virol. 76: 185, 2002)
 ELRQHLLRWGL (SEQ ID NO: 2) (Casimiro et al, J. Virol. 76: 185, 2002)
 ELREHLLKWGF (SEQ ID NO: 3) (homólogo al número 2, idéntico a nuestra secuencia).

10 Estos tres péptidos se mezclaron juntos en una concentración de 10 µg/mL (la concentración de péptido total fue de 30 µg/mL) y se añadieron a pocillos por triplicado. Los resultados del ensayo ELISPOT presentados fueron llevados a cabo 26 días después del segundo recuerdo.

15 La detección de anticuerpos específicos de Rat/neu se realizó mediante ELISA. El antígeno Rat/neu para uso como reactivo ELISA se preparó como se indica a continuación: se añadió una etiqueta de histidina mediante PCR al extremo C de la secuencia codificadora de Rat/neu en pRAT/neu n°14. Este producto amplificado mediante PCR fue digerido y ligado en el plásmido de replicón de VEE, pERK. Se electroporaron células BHK con ARN generado a partir de la construcción pERK Rat/neu-his. A las 16 horas después de la electroporación, se prepararon los lisatos celulares y se purificaron en una columna de afinidad de níquel, alcanzando un 60-70% de pureza del antígeno Rat neu marcado con his.

20 Los sueros del Día 51 (7 días después del recuerdo) fueron evaluados para determinar la presencia de anticuerpos específicos de Rat/neu mediante un ELISA indirecto. Se recubrieron placas Nunc de alta unión a 4°C durante una noche con 75 ng/pocillo de Rat neu marcado con his en tampón de recubrimiento de carbonato-bicarbonato. Al siguiente día las placas fueron bloqueadas con 200 µL/pocillo de BSA al 3% en PBS durante 1 hora a 30°C. Después de 6 lavados en PBS, se diluyeron 50 µL de muestras de suero de ratón en BSA al 1%, Tween 20 al 0,05% en PBS y se añadieron a cada pocillo, y las placas fueron incubadas durante 1 h a 30°C. Para cada animal experimental, se evaluaron pre-sangrados a 1:40 y 1:80, así como diluciones a la mitad desde 1:40 – 1:1280, de los sueros del día 51. A continuación las placas fueron lavadas 6 veces con PBS, seguido de la adición de 50 µL/pocillo de una dilución 1:500 de HRP anti-ratón de cabra y se incubaron durante 1 h a 30°C. Las placas fueron lavadas como antes y desarrolladas con 100 µL/pocillo de ABTS (KPL), y se leyó una absorbancia a 405 nm usando un lector ELISA estándar. El valor de corte para determinar una muestra positiva se determinó promediando el valor de DO (absorbancia) de todas las muestras de suero de pre-sangrado diluidas 1:40 y multiplicando dicho valor por dos. Todas las muestras con una DO superior al valor de corte se consideraron positivas.

35 La detección de anticuerpos específicos anti-CAT se realizó mediante ELISA. Se desarrolló un ELISA de anticuerpos anti-CAT para detectar respuestas inmunes anti-CAT en ratones vacunados con ARP multi-antigénicos. Se cargaron microplacas ELISA recubiertas con anticuerpos policlonales anti-CAT de oveja (Roche, Indianapolis, IN) con 0,15 ng de proteína CAT purificada suspendida en tampón de muestreo CAT ELISA (Roche) en un volumen de 50 µL por pocillo. Las placas ELISA fueron incubadas a 37°C durante 45 minutos y lavadas tres veces con 0,2 mL de tampón de lavado CAT ELISA (Roche). Se cargaron 50 µL por pocillo de suero de ratón, diluido en serie a la mitad en tampón de muestreo, y las placas se incubaron a 37°C durante 45 minutos. Tras la incubación, las placas ELISA fueron lavadas tres veces como se ha descrito anteriormente. A cada pocillo se añadió (0,1 mL por pocillo) anticuerpo secundario conjugado a HRP anti-ratón de cabra (Kirkegaard and Perry Laboratories (KPL), Gaithersburg, MD) diluido 1:500 en tampón de muestreo y se incubó a 37°C durante 45 minutos. Tras la incubación, las placas fueron lavadas tres veces como se ha descrito antes, y se añadieron 0,1 mL de sustrato de ABTS peroxidasa (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-b-sulfónico; KPL) por pocillo. El desarrollo de color finalizó mediante la adición de 0,1 mL de disolución de parada (KPL) y se leyó la absorbancia de las placas a 405 nm usando un lector de microplacas Molecular Devices Versamax. El valor de corte para determinar una muestra positiva se determinó promediando el valor de DO de todas las muestras de suero pre-sangradas diluidas 1:40 y multiplicando dicho valor por dos. Todas las muestras con una DO superior al valor de corte se consideraron positivas.

50 La detección de anticuerpos específicos de CMV gB se realizó mediante Western blot. El análisis de respuestas inmunes anti-gB en animales vacunados con ARP multi-antigénico se realizó mediante Western blot. La proteína gB purificada, recombinante, marcada con histidina, fue sometida a electroforesis a través de geles 4-10% Bis-Tris NuPAGE (gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida; Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transfirieron a membranas de PVDF usando una unidad de electroforesis Novex mini-cell (Invitrogen). Los sueros de pre-sangrado y de post-vacunación del Día 51 fueron diluidos 1:40 ó 1:80 para todos los animales en tampón de bloqueo (Invitrogen) y se incubaron en tiras de membranas de PVDF después de la transferencia de proteína gB. Como anticuerpo secundario se usó anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina anti-ratón de cabra (Sigma, St. Louis, MO) diluido 1:10.000 en tampón de bloqueo. Los análisis Western blot se desarrollaron usando BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/nitroazul de tetrazolio; Bio Rad, Hercules, CA), y el desarrollo de color se detuvo mediante lavado con agua destilada. Las muestras positivas fueron identificadas mediante detección visual de bandas inmunorreactivas con movilidad electroforética coincidentes con el peso molecular esperado de la gB en el inmunoblot.

La detección de anticuerpos específicos de HA de gripe se realizó mediante ensayo de inmunofluorescencia (IFA). El análisis de respuestas inmunes anti-HA en animales vacunados con ARP multi-antigénico se determinó mediante IFA. Se electroporaron células Vero con un vector de replicón de VEE que expresaba el gen HA de gripe H1N1 y se sembraron 1×10^4 células electroporadas por pocillo en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos. Las células Vero electroporadas fueron fijadas con metanol a las 16h de la electroporación. Los sueros de pre-sangrado y del día 56 post-vacunación fueron diluidos a la mitad desde 1:40 hasta 1:160 en tampón de bloqueo (PBS:FBS (1:1)) para todos los animales, y se incubaron en células Vero que expresan proteína HA. Se usó un anticuerpo conjugado a Alexa Fluor 488 anti-ratón de cabra (Molecular Probes, Eugene, OR) diluido 1:400 como anticuerpo secundario. Las células fueron analizadas en un microscopio Nikon Eclipse TE300 UV para fluorescencia específica de HA. Se determinó el título mediante detección visual de células inmunofluorescentes al menor valor de dilución de suero detectable.

La detección de anticuerpos específicos de IE1 anti-CMV se realizó mediante ELISA. Como cubierta de antígeno se usó IE1 marcada con histidina (his) recombinante purificada procedente de CMV. Resumidamente, se transfectaron células BHK con ARN de replicón de VEE que expresa his-IE1 y se prepararon lisatos de Triton-X 100. La proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad de ion metálico.

Los sueros del Día 51 (7 días después del recuerdo) fueron evaluados para determinar la presencia de anticuerpos específicos de CMV-IE1 mediante un ELISA indirecto estándar. Para la detección de Ig total específica de CMV-IE1, se usó un anticuerpo policlonal secundario que detecta IgM, IgG e IgA para la determinación del punto final de la valoración. Resumidamente, se recubrieron placas ELISA de 96 pocillos Maxisorp (Nunc, Naperville, IL) con $2 \mu\text{g}$ de IE1 en un volumen de $50 \mu\text{L}$ de citrato/fosfato, pH 8,3, por pocillo. Las placas se taparon con plástico adhesivo y se incubaron durante una noche a 4°C . Al siguiente día, se descartó el antígeno no ligado y las placas se incubaron durante 1 hora con $200 \mu\text{L}$ de tampón de bloqueo (PBS que contenía un 3% p/v de BSA) a temperatura ambiente. Los pocillos fueron lavados 6 veces con PBS y se añadieron $50 \mu\text{L}$ de suero, diluido en serie a la mitad en tampón (PBS con un 1% p/v de BSA y un 0,05% v/v de Tween 20), a los pocillos recubiertos de antígeno. Se incluyó un anticuerpo monoclonal α -IE1 (Rumbaugh-Goodwin Institute for Cancer Research, Inc, Plantation, Florida) en cada ensayo como control positivo. Los controles negativos de cada ensayo incluyeron blancos (pocillos con todos los reactivos y tratamientos excepto el suero) y sueros pre-sangrados. Las placas fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente, y a continuación se lavaron 6 veces con PBS. A cada pocillo se añadieron cincuenta μL /pocillo de anticuerpo secundario poli-isotipo anti-ratón de cabra conjugado a fosfatasa alcalina (AP) (Sigma) diluido hasta una concentración predeterminada en tampón diluyente, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos fueron lavados 6 veces con PBS antes de la adición de $100 \mu\text{L}$ de sustrato de p-nitrofenil fosfato (pNPP) (Sigma). El título ELISA de anticuerpo en suero se definió como el inverso de la mayor dilución de suero que proporciona una densidad óptica a 405 nm superior o igual a 0,2 por encima del ruido de fondo (pocillos de blanco).

Resumen de respuesta inmune a ARP multi-antigénico

Tal como se muestra en la Figura 1 y en la Tabla 3, los animales vacunados con ARP multi-antigénico montaron respuestas inmunes para los siete antígenos presentes en la población de ARP. Estas respuestas inmunes incluyeron tanto respuestas humorales como celulares, lo que indica que este tipo de estrategia puede estimular ambos brazos del sistema inmune. La fortaleza de la respuesta inmune a un antígeno específico también se midió en el contexto del ARP multi-antigénico y se comparó con una preparación de ARP de antígeno individual. El anticuerpo anti-Gag y las respuestas inmunes celulares fueron equivalentes tanto si el ARP de VIH-Gag estaba solo o en una formulación multi-antigénica, lo que indica que una adición de una pluralidad de antígenos diferentes no parece disminuir la respuesta inmune a cada componente individual de la preparación. Dicha preparación multi-antigénica estaba compuesta intencionadamente por genes procedentes de agentes de enfermedades infecciosas (VIH y CMV), antígeno de cáncer (Rat/neu) y enzima bacteriana (CAT) para demostrar que el sistema inmune del hospedante puede ser estimulado con ARP multi-antigénico para responder a un amplio sistema de tipos de antígeno dentro de una única preparación de ARP.

Ejemplo 7. Estudios en animales de ARPs multi-antigénicos que expresan una biblioteca de ADNc tumoral.

Se genera una biblioteca de ADNc a partir de la línea celular de melanoma de ratón pigmentada B16F10 (B16) [Gold et al., (2003) *J. Immunol.* 170: 5188-5194] derivada originalmente de ratones C57BL/6. Esta biblioteca es clonada direccionalmente en la construcción de ADNc de replicón alfaviral de tal modo que el ADNc heterólogo es expresado a partir del replicón tras infección de una célula diana. Los ARP son generados y purificados como se ha descrito anteriormente para producir una población de partículas de ARP que expresan una biblioteca completa de ADNcs a partir de células tumorales B16. La expresión de genes representativos tales como β -actina puede analizarse mediante PCR cuantitativa para determinar si la biblioteca expresa patrones génicos conocidos. Se puede usar una hibridación sustractiva o una presentación diferencial contra una línea celular no tumorigénica genéticamente coincidente para potenciar la proporción de secuencias específicas de tumor de la biblioteca.

Se vacunan ratones C57BL/6 con la preparación de ARP de biblioteca B16 una, dos o tres veces en los días 0, 21 y 42. Se administran dosis de entre 10^5 y 10^9 i.u. en ARP vía ruta subcutánea (s.c.) administradas en ambas almohadillas de la patas traseras del ratón. Los grupos de ratones de control recibieron vacunaciones de placebo o

de ARP que expresan antígenos irrelevantes. Se puede incluir un grupo adicional de animales que reciben ARP que expresan antígenos tumorales individuales específicos de melanoma conocidos, tales como TYR, TRP-2, gp100, MAGE-1 o MAGE-3, o una combinación de dichos antígenos como comparación con la estrategia multi-antigénica.

5 Los ratones son inyectados intradérmicamente (i.d.) con 10^4 , 10^5 ó 10^6 células de melanoma B16 en el costado derecho 5 días después de la inmunización final con ARP. A continuación se realiza un seguimiento de los ratones para determinar la aparición del tumor mediante palpación cada dos días. Los tumores se puntúan como presentes una vez que alcanzan un diámetro igual o superior a 2 mm. Los ratones son sacrificados una vez que se asegura que el tumor está progresando (normalmente con un tamaño de 1 cm). Se construyen curvas de supervivencia libre de tumor de Kaplan-Meier y se lleva a cabo un análisis log-rank para determinar la significación estadística de la protección de la exposición al tumor entre los diferentes grupos.

Antes de la exposición a tumor, se recolectan sueros y linfocitos de ratones para inmunoensayo. La presencia de respuestas humorales o celulares a antígenos tumorales conocidos que se espera que estén presentes en los ARP de biblioteca B16 se pueden evaluar usando métodos y técnicas estándares conocidos en la técnica.

15 El melanoma canino maligno (CMM) es un neoplasma espontáneo, agresivo y metastásico que se da en perros. El CMM es un tumor diagnosticado con relativa frecuencia y contabiliza aproximadamente el 4% de todos los tumores caninos. El CMM se trata inicialmente con terapias locales que incluyen cirugía y/o terapia de radiación fraccionada; sin embargo, una secuela habitual es la enfermedad metastásica sistémica. El CMM es un neoplasma quimio-resistente. Todas estas propiedades son comunes al melanoma humano y, en base a dichas similitudes, el CMM sirve como modelo clínico para evaluar nuevos tratamientos para el melanoma humano [Bergman et al. (2003) Clin. Cancer Res. 9: 1284-1290].

20 Los perros son escrutados para determinar la presencia de melanoma maligno espontáneo confirmado histológicamente. La evaluación previa al ensayo incluye una evaluación física completa, un recuento sanguíneo completo y un recuento plaquetario, un perfil químico de suero, análisis urinario, LDH, anticuerpos anti-nucleares, y medidas tridimensionales del tumor primario, si está presente (o el tamaño tumoral máximo a partir de registros médicos si el paciente ha sido tratado antes de las consideraciones pre-ensayo). Para la evaluación de enfermedad metastásica, se obtienen radiografías de 3-vistas del tórax y se evalúan los nodos linfáticos regionales con aspiración/citología con aguja fina y/o con biopsia/histopatología. Todos los perros son clasificados según el sistema de clasificación WHO como tumores de estadio II (tumores de 2-4 cm de diámetro, nodos negativos), estadio III (tumor >4 cm y/o nodos positivos) o estadio IV (enfermedad metastásica distante). Los perros de estos tres estadios de la enfermedad son incluidos en el estudio, siempre que no hayan recibido ninguna otra forma de terapia en las tres semanas previas.

35 Se usa la aspiración con aguja fina o la biopsia para confirmar el melanoma maligno en cada animal mediante citología o histopatología, respectivamente. Estas muestras, tomadas de la masa tumoral primaria o de las masas metastatizadas, se usan como fuente de la biblioteca de ADNc tumoral. Para cada animal, se aísla ARN tumoral de la población de células tumorales. Se prepara una biblioteca de ADNc a partir de cada muestra. Se generan preparaciones de ARP multi-antigénicas para cada animal tal como se describe en la presente memoria.

40 Las cohortes de perros reciben vacunaciones múltiples de preparaciones de ARP específicas de paciente canino con un rango de dosis. Los perros son vacunados entre 3 y 12 veces a lo largo de un periodo de 1-3 meses. Las dosis de ARPs administradas vía ruta subcutánea, intradérmica o intramuscular oscilan entre 10^6 y 10^9 i.u. Además de administrar vacunas de ARP específicas del paciente (autólogas), algunas cohortes pueden recibir preparaciones de otros pacientes (alogénicas) a fin de determinar si una preparación de vacuna de un melanoma alternativo proporciona un beneficio clínico.

45 El estatus clínico de cada paciente es monitorizado a lo largo del régimen de vacunación y hasta dos años después del tratamiento. Los pacientes son examinados física, radiológica y bioquímicamente de forma frecuente para determinar evidencias clínicas de presencia tumoral y de progresión o regresión del tumor. Si los dueños solicitan eutanasia en el caso de deterioro de la calidad de vida debido al avance de la enfermedad, se lleva a cabo una necropsia completa con un examen de necropsia posterior para determinar el estatus general e histopatológico del tumor en el sitio primario y el sitio metastásico. Se realiza un análisis estadístico para determinar el efecto de vacunación de ARP multi-antigénica en la supervivencia y la progresión de la enfermedad. Las herramientas de análisis estadístico incluyen el método de límite de producto Kaplan-Meier, el análisis de peligro proporcional Cox, el test U de Mann-Whitney y una correlación de rango de Spearman.

Tabla 1.

Valoración de ARPs multi-antigénicos (Conjunto de 10 construcciones)	
Vector de replicón	Título de ARP
CAT (cloranfenicol acetiltransferasa)	$3,6 \times 10^8$ /mL
β -gal	$1,3 \times 10^5$ /mL
Rat/neu	$5,2 \times 10^8$ /mL
Luciferasa	$6,8 \times 10^6$ /mL
PkMSP1-42	$4,5 \times 10^8$ /mL
PyHep17	$2,0 \times 10^8$ /mL
PfAMA1	$4,0 \times 10^7$ /mL
PkCSP	$5,7 \times 10^8$ /mL
VIH Gag	$1,5 \times 10^9$ /mL
Antígeno A de cáncer	$4,5 \times 10^8$ /mL
Total/mL	$4,1 \times 10^9$/mL
Total de cubeta de electroporación individual	$8,2 \times 10^{10}$

Tabla 2.

Valoración de ARPs multi-antigénicos producidos a partir de un conjunto de siete ARNs		
Vector de replicón	Título de ARP en el medio	Título de ARP en lavado con sal
CMV IE1	$2,9 \times 10^6$ /mL	$1,9 \times 10^8$ /mL
CMV gB	$2,9 \times 10^5$ /mL	$5,8 \times 10^7$ /mL
Gripe HA	$1,3 \times 10^5$ /mL	$1,9 \times 10^7$ /mL
VIH pol	$3,4 \times 10^6$ /mL	$3,3 \times 10^8$ /mL
VIH Gag	$4,2 \times 10^7$ /mL	$2,9 \times 10^9$ /mL
Rat/neu	$1,9 \times 10^6$ /mL	$2,6 \times 10^8$ /mL
CAT (cloranfenicol acetiltransferasa)	$2,3 \times 10^6$ /mL	$2,9 \times 10^8$ /mL
Total/mL	$5,7 \times 10^7$/mL	$4,1 \times 10^9$/mL
Total de cubeta de electroporación individual	$1,1 \times 10^{10}$	$8,2 \times 10^{10}$
Título de ARP agrupado total	$9,3 \times 10^{10}$	

5 Tabla 3.

Respuestas inmunes específicas de antígeno en animales inmunizados con ARPs multi-antigénicos								
Grupo de vacunación	VIH GAG ELISA	VIH GAG ELISPOT	VIH POL ELISPOT	FLU HA IFA	CMV gB Western	CAT ELISA	Rat/neu ELISA	CMV IE1 ELISA
ARP Multi-Ag s.c. almohadilla pata	8192	475	614	160 ^a	80 ^a	1280 ^a	1280 ^a	1280
ARP Multi-Ag i.p.	40960 ^a	439	105	160 ^a	80 ^a	1280 ^a	320	2560 ^a
ARP VIH GAG s.c. almohadilla pata	5120	500	0 ^b	10 ^b	10 ^b	10 ^b	10 ^b	10 ^b
Control negativo s.c. almohadilla pata	10 ^b	0 ^b	0 ^b	10 ^b	10 ^b	10 ^b	10 ^b	10 ^b

^a Muestras no evaluadas hasta punto final, los títulos reales son iguales o superiores a esta medida.
^b En el límite de detección del ensayo o por debajo de él.

Referencias citadas en la presente solicitud

5 Casimiro DR, Tang A, Perry HC, Long RS, Chen M, Heidecker GJ, Davies ME, Freed DC, Persaud NV, Dubey S, Smith JG, Havlir D, Richman D, Chastain MA, Simon AJ, Fu TM, Emini EA, Shiver JW. Vaccine-induced immune responses in rodents and nonhuman primates by use of a humanized human immunodeficiency virus type 1 pol gene. *J. Virology*. 2002. 76:185-195, 2002

Chen GJ, Qiu N, Karrer C, Caspers P, and Page MG. Restriction site-free insertion of PCR products directionally into vectors. *Biotechniques*. 2000; 28(3):498-500, 504-5.

Chen GJ, Qiu N, Page MP. Universal restriction site-free cloning method using chimeric primers. *Biotechniques*. 2002; 32(3):516, 518-20.

10 Heiser, A., Coleman, D., Dannull, J., Yancy, D., Maurice, M., Lallas, C., Dahm, P., Niedzwiecki, D., Gilboa, E. and J. Vieweg. *J. Clinical Investigation*. 2002. 109(3):409-417.

Kumamoto, T., Huang, E., Paek, H-J., Morita, A., Matsue, H., Valentini, R., and A. Takashima. *Nature Biotechnology*. 2002. 20:64-69.

Rayner, JO, Dryga, S.A. and Kurt I. Kamrud. Alphavirus vectors and vaccination. *Rev. Med. Virol*. 2002. 12:279-296.

15 Sadanaga N, Nagashima H, Mashino K, Tahara K, Yamaguchi H, Ohta M, Fujie T, Tanaka F, Inoue H, Takesako K, Akiyoshi T, Mori M. Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin. Cancer Res*. 2001 Aug; 7(8):2277-84.

Yamanaka, R., Zullo, S.A., Tanaka, R., Blaese, M., and K.G. Xanthopoulos. Enhancement of antitumor immune response in glioma models in mice by genetically modified dendritic cells pulsed with Semliki forest virus-mediated complementary DNA. *J. Neurosurg*. 2001. 94(3):474-81.

20 Ward S, Casey D, Labarthe MC, Whelan M, Dalglish A, Pandha H, Todryk S. Immunotherapeutic potential of whole tumour cells. *Cancer Immunol. Immunother*. 2002. 51 (7):351-7.

Ying, H., Zaks, T.Z. Rong-Fu, W., Irvine, K.R., Kammula, U.S. Marincola, F.M. Leitner, W.W. and N.P. Restifo. Cancer therapy using a self-replicating RNA vaccine. *Nature Medicine*. 1999. 7(5):823-827

25 **Lista de secuencias**

- <110> AlphaVax, Inc.
Smith, Jonathan F.
Kamrud, Kurt
Dryga, Sergey
30 Caley, Ian
- <120> Partículas de replicón de alfavirus multi-antigénico y métodos
- <130> 95-02 WO
- <140> pendiente de cesión
<141> 2003-12-12
- 35 <150> US 60/433,299
<151> 2002-12-13
- <150> US 60/433,058
<151> 2002-12-13
- <160> 3
- 40 <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 45 <220>
<223> Epítipo peptídico de Pol CTL murino

ES 2 618 309 T3

<400> 1

Val Tyr Tyr Asp Pro Ser Lys Asp Leu Ile Ala
1 5 10

<210> 2

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Epítipo peptídico de Pol CTL murino

<400> 2

10 Glu Leu Arg Gln His Leu Leu Arg Trp Gly Leu
1 5 10

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Epítipo peptídico de Pol CTL murino

<400> 3

Glu Leu Arg Glu His Leu Leu Lys Trp Gly Phe
1 5 10

20

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método para preparar una población de partículas de replicón de virus (VRPs) del virus de encefalitis equina venezolana (VEE) que colectivamente codifican y expresan una biblioteca de expresión de un patógeno, parásito o célula tumoral, en donde las partículas con defecto de propagación no pueden producir partículas de progenie debido a la ausencia en el ARN del replicón de al menos una secuencia que codifica para una proteína estructural del virus VEE requerida para el empaquetamiento del ácido nucleico del replicón, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 10 a) introducir una pluralidad de ácidos nucleicos de replicón de VEE en una pluralidad de células, en donde dichas células son permisivas para la replicación y empaquetamiento de VEE, en donde dicho ácido nucleico de replicón de VEE comprende al menos una señal de empaquetamiento de virus VEE y al menos una secuencia codificadora heteróloga expresable a partir de dicho ácido nucleico de replicón de VEE, en donde las secuencias que codifican las proteínas estructurales requeridas para el empaquetamiento del ácido nucleico de replicón se distribuyen entre uno o más ácidos nucleicos colaboradores y el ARN de replicón, y en donde el uno o más ácidos nucleicos colaboradores se seleccionan de entre al menos dos moléculas de ARN colaborador o una molécula de ADN, siempre que se elimine al menos una secuencia codificadora de proteína estructural del ARN de replicón, de tal modo que la partícula de VEE resultante tenga defecto de propagación, y en donde la pluralidad de ácidos nucleicos de replicón de VEE codifican la biblioteca de expresión de un patógeno, parásito o célula tumoral, para producir una pluralidad de células modificadas;
- 15 b) cultivar dicha pluralidad de células modificadas de la etapa (a) en condiciones que permitan la expresión del uno o más ácidos nucleicos colaboradores, permitiendo la replicación de dicho ácido nucleico de replicón de VEE y el empaquetamiento de dicho ácido nucleico de replicón de VEE para formar VRPs;
- 20 c) poner en contacto las células modificadas tras la etapa (b) con un medio acuoso que contiene entre 0,2 M y 5 M de una sal para liberar las VRPs al medio acuoso para producir una disolución que contiene VRPs; y
- d) recolectar las VRPs de la disolución que contiene VRPs de la etapa (c);
- 25 en donde el ácido nucleico de replicón se introduce en dicha célula hospedante mediante electroporación; y en donde la densidad celular en el ámbito de la electroporación es de 10^7 a 5×10^8 por mL.
- 2.** El método de la reivindicación 1, en donde las secuencias codificadoras de proteína estructural del virus VEE se distribuyen entre (i) un primer ARN colaborador y un segundo ARN colaborador, o (ii) un único ADN colaborador que codifica todas las proteínas estructurales de VEE.
- 30 **3.** El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más ácidos nucleicos colaboradores de la célula hospedante de la etapa (a) es una secuencia de ácido nucleico integrada de forma estable en el genoma de dicha célula hospedante.
- 4.** El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más ácidos nucleicos colaboradores de la célula codifican una proteína de cápsida capaz de unirse a dicho ácido nucleico de replicón de VEE, y a al menos una glicoproteína de VEE, en donde dicha glicoproteína de VEE se asocia con dicho ácido nucleico de replicón de VEE y con dicha proteína de cápsida, en donde el uno o más ácidos nucleicos colaboradores se introducen en la célula junto con dicho ácido nucleico de replicón de VEE.
- 35 **5.** El método de la reivindicación 1, en donde, cuando el uno o más ácidos nucleicos colaboradores son al menos dos moléculas de ácido nucleico colaborador, cada una de dichas dos moléculas de ácido nucleico colaborador codifica al menos una función colaboradora de VEE.
- 40 **6.** El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más ácidos nucleicos colaboradores y el ARN de replicón de VEE son moléculas de ARN.
- 7.** El método de la reivindicación 6, en donde al menos una molécula de ARN colaborador no está tapada.
- 8.** El método de la reivindicación 1, en donde la electroporación se lleva a cabo en una cubeta de electroporación.
- 45 **9.** El método de la reivindicación 1, en donde la etapa (d) viene seguida de una etapa de cromatografía de intercambio iónico o de una etapa de cromatografía de afinidad de heparina.
- 10.** El método de la reivindicación 1, en donde la VRP de VEE se une a heparina.
- 11.** El método de la reivindicación 1, en donde el VEE es un VEE atenuado.
- 12.** El método de la reivindicación 11, en donde el VEE atenuado es la cepa 3014.

13. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de lavado emplea NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, acetato de NH₄ o bicarbonato de NH₄.
- 5 14. Un método para fabricar una vacuna para inmunizar a un humano o animal contra un parásito, patógeno o cáncer, que comprende el método de la reivindicación 1, y en donde la etapa (d) según la reivindicación 1 va seguida de la etapa de fabricación de una vacuna que comprende una cantidad de la población de partículas de replicón de VEE (VRPs) infecciosas con defecto de propagación para generar una respuesta inmune frente al menos un antígeno de dicho parásito, patógeno o cáncer; en donde el patógeno es, opcionalmente, un virus, una bacteria, una levadura, un hongo o un protozoo.
- 10 15. El método de la reivindicación 14, en donde el virus es un virus gripal, un virus de herpes, un virus paragripal, un virus sincitial respiratorio, citomegalovirus, papiloma humano o virus de inmunodeficiencia humano.
16. El método de la reivindicación 14, en donde el protozoo es *Plasmodium falciparum* o en donde la bacteria es *Mycobacterium tuberculosis*.
- 15 17. El método de la reivindicación 14, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer pancreático, cáncer de riñón, sarcoma, neuroblastoma, glioma, cáncer de colon, melanoma, cáncer de mama, cáncer de ovario y cáncer de próstata.
18. El método de la reivindicación 1, en donde la pluralidad de células se selecciona del grupo que consiste en células Vero, de riñón de hámster bebé (BHK), DF1, CHO, 293, 293T, fibroblasto de embrión de pollo y células de insecto tales como SF21, *Spodoptera frugiperda*; C6/36, *Aedes albopictus*; TRA-171, *Toxorhynchites amboinensis*; RML-12, *Aedes aegypti*; AP-61, *Aedes pseudo-scutellaris*; y MOS-55, *Anopheles gambiae*.

20

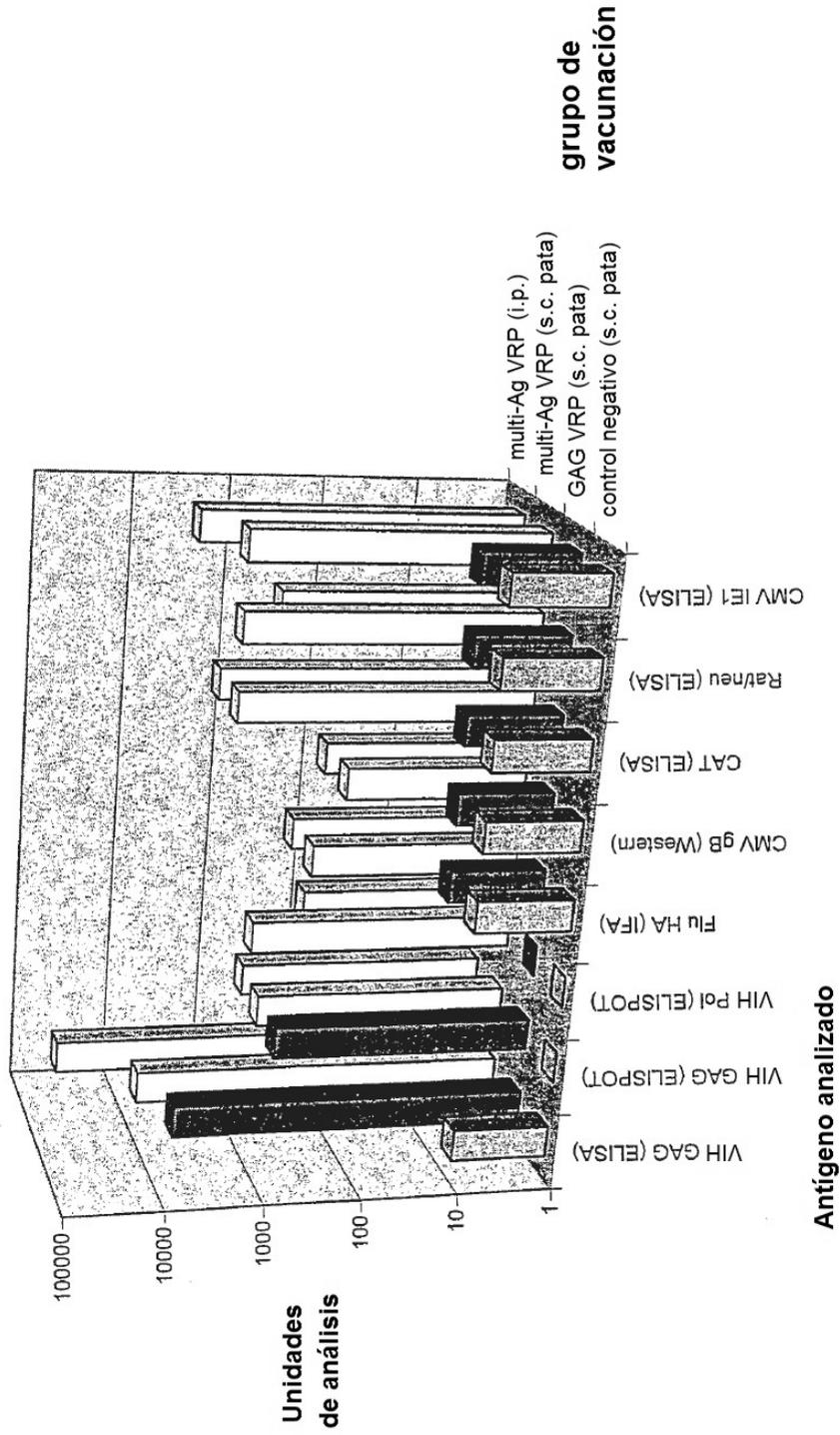


FIG. 1