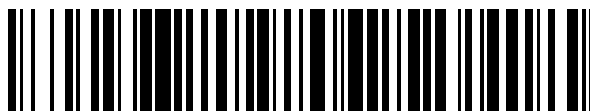


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 854**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/21 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/87 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2002 E 10006727 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2305299**

54 Título: **Partículas de replicón de alfavirus quimérico**

30 Prioridad:

31.05.2001 US 295451 P

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

17.07.2017

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**POLO, JOHN;
PERRI, SYLVIA y
THUDIUM, KENT**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 624 854 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 quimérico

Campo técnico

5 La presente invención se refiere de manera general a partículas de alfavirus quimérico. Más específicamente, la presente invención se refiere a la preparación de alfavirus quiméricos, como se reivindica, que tienen ARN derivado de al menos un alfavirus y uno o más elementos estructurales (cápside y/o envoltura) derivados de al menos dos alfavirus diferentes. Los alfavirus quiméricos de la presente invención son útiles en la administración *ex vivo* e *in vivo* de genes heterólogos que tienen aplicaciones terapéuticas o profilácticas.

Antecedentes

10 Los alfavirus comprenden un conjunto de virus transmitidos por artrópodos, relacionados genética, estructural y serológicamente de la familia *Togaviridae*. Se han clasificado veintiséis virus y subtipos de virus conocidos dentro del género *Alphavirus*, incluyendo, virus Sindbis, virus del bosque Semliki, virus del río Ross y virus de la encefalitis equina venezolana.

15 El virus Sindbis es el miembro prototipo del género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*. Su estrategia de replicación se ha caracterizado bien en diversos cultivos celulares y sirve como modelo para otros alfavirus. Brevemente, el genoma del virus Sindbis (como otros alfavirus) es una molécula de ARN de sentido positivo y monocatenario de 12 kb con casquete y poliadenilada, y contenida en una cubierta proteica, la cápside, codificada por el virus. La nucleocápside se rodea además de una envoltura lipídica, derivada del hospedador, dentro de la que hay insertadas dos glucoproteínas específicas víricas, E1 y E2, que están insertadas y ancladas por una cola citoplasmática a la nucleocápside. Ciertos alfavirus (por ejemplo, SFV) mantienen también una proteína adicional, E3, que es un producto de escisión de la proteína precursora de E2, PE2.

20 Tras la adsorción de las partículas víricas en las células diana, la penetración y el desprendimiento de la nucleocápside para liberar el ARN genómico del virus dentro del citoplasma, el proceso de replicación tiene lugar a través de cuatro proteínas no estructurales (nsP, del inglés *nonstructural proteins*), traducidas de los dos tercios del extremo 5' del genoma vírico. A su vez, la síntesis de un ARN de cadena negativa de longitud completa, proporciona un molde para la síntesis de ARN genómico de cadena positiva adicional y un ARN 26S subgenómico expresado de manera abundante, se inicia internamente en la región de unión del promotor. Las proteínas estructurales del alfavirus se traducen a partir del ARN 26S subgenómico, que representa el primer tercio del extremo 3' del genoma, y al igual que las nsP, se procesan de manera postraduccional en las proteínas individuales.

25 Se están desarrollando varios miembros del género *Alphavirus* como vectores de expresión "replicones" para su uso como vacunas y compuestos terapéuticos. Los vectores replicones se pueden utilizar en varios formatos, incluyendo ADN, ARN y partículas de replicones recombinantes. Tales vectores replicones han derivado de alfavirus que incluyen, por ejemplo, virus Sindbis (Xiong y col. (1989) *Science* 243:1188-1191; Dubensky y col., (1996) *J. Virol.* 70:508-519; Hariharan y col. (1998) *J. Virol.* 72:950-958; Polo y col. (1999) *PNAS* 96:4598-4603), virus del bosque Semliki (Liljestrom (1991) *Bio/Technology* 9:1356-1361; Berglund y col. (1998) *Nat. Biotech.* 16:562-565), virus de la encefalitis equina venezolana. (Pushko y col. (1997) *Virology* 239:389-401). Una amplia bibliografía demuestra en la actualidad la eficacia de los vectores replicones de alfavirus en aplicaciones tales como vacunas (véase, por ejemplo, Dubensky y col., *ibid*; Berglund y col., *ibid*; Hariharan y col., *ibid*, Pushko y col., *ibid*; Polo y col., *ibid*; Davis y col. (2000) *J. Virol.* 74:371-378; Schlesinger y Dubensky (1999) *Curr Opin. Biotechnol.* 10:434-439; Berglund y col. (1999) *Vaccine* 17:497-507). Hablando de manera general, una partícula de "replicón" se refiere a una partícula vírica que contiene un ácido nucleico autorreplicante. La propia partícula de replicón se considera de manera general incompetente o "defectuosa" en la replicación. es decir, que no se dará una progenie de partículas de replicón cuando se infecte una célula por una partícula de replicón. A través de los años, han surgido varias expresiones sinónimas que se usan para describir las partículas de replicón. Estas expresiones incluyen partícula vírica recombinante, partícula de alfavirus recombinante, partícula de replicón de alfavirus y partícula de replicón. Sin embargo, tal como se usa en el presente documento, todas estas expresiones se refieren a una unidad de tipo virión que contiene un vector replicón de ARN derivado de un virus, específicamente, un vector replicón de ARN de alfavirus. Además, estas expresiones pueden referirse de manera colectiva como vectores, construcciones de vector o vectores de administración de genes.

30 En la actualidad, se están desarrollando varios alfavirus como sistemas de administración de genes para vacunas y otras aplicaciones terapéuticas. Aunque generalmente son bastante similares en sus características globales (por ejemplo, estructura, replicación), cada alfavirus puede presentar alguna propiedad particular (por ejemplo, unión al receptor, sensibilidad al interferón y perfil de enfermedad) que es único. Para aprovechar las propiedades más deseables de cada virus, se ha desarrollado un enfoque de una partícula de replicón quimérica. Específicamente, una partícula de replicón de alfavirus quimérico puede tener ARN derivado de un virus y uno o más componentes estructurales derivados de un virus diferente. Los componentes víricos derivan generalmente de virus estrechamente relacionados; sin embargo, son posibles las partículas de virus quiméricos creadas a partir de familias de virus divergentes.

Se demostró previamente que se pueden generar partículas de replicón de alfavirus quimérico, en las que el vector de ARN deriva de un primer alfavirus y las proteínas estructurales de la "cubierta" (por ejemplo, glucoproteínas de la envoltura) derivan de un segundo alfavirus (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos con número de serie 09/236.140; véanse también, las Patentes de Estados Unidos 5.789.245, 5.842.723, 5.789.245, 5.842.723 y 6.015.694; así como los documentos WO 95/07994, WO 97/38087 y WO 99/18226). Sin embargo, aunque las estrategias descritas anteriormente fueron satisfactorias para crear varias quimeras de alfavirus, tales partículas quiméricas no siempre se producen en rendimientos comercialmente viables, quizás debido a interacciones menos eficaces entre el ARN vírico y las proteínas estructurales, dando como resultado una productividad disminuida.

Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de composiciones que comprendan y de procedimientos que preparen y utilicen partículas de replicones quiméricas y replicones, por ejemplo, para su uso como vehículos de administración de genes que tienen un tropismo celular y tisular alterado y/o una antigenicidad superficial frente a proteínas estructurales.

Resumen

La invención proporciona un ARN de replicón de alfavirus que comprende una secuencia 5' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural, secuencias que codifican proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas, un promotor subgenómico de alfavirus, una secuencia heteróloga que no es de alfavirus, y una secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural, en la que la secuencia que codifica al menos una de dichas proteínas no estructurales deriva del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) y en la que la secuencia de dicho ARN del replicón presenta entre el 33,33 % y el 66,67 % de identidad de secuencia con el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) en toda la longitud del genoma del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) y en la que el ARN del replicón de alfavirus comprende secuencias que derivan del virus Sindbis (SIN), en las que las secuencias derivadas de SIN comprenden una señal de empaquetamiento insertada en un sitio seleccionado de la unión de nsP3 con nsP4, después de la fase abierta de lectura de nsP4, y una delección en un gen de proteína no estructural.

La invención también proporciona un procedimiento para producir partículas de replicón de alfavirus que comprende la introducción del ARN del replicón del alfavirus descrito anteriormente y un ARN auxiliar defectuoso que es capaz de amplificarse y expresar una o más proteínas estructurales del alfavirus en una célula hospedadora en condiciones que permitan la formación de las partículas.

La invención también proporciona una partícula de replicón de alfavirus que comprende el ARN del replicón de alfavirus descrito anteriormente.

La invención incluye partículas de alfavirus quimérico tal como se reivindica, que comprenden (a) ARN que codifica una o más proteínas estructurales que derivan de un primer alfavirus y una señal de empaquetamiento que deriva de un segundo alfavirus diferente de dicho primer alfavirus (una señal de alfavirus insertada en un sitio seleccionado del grupo que consiste en la unión de nsP3 con nsP4, después de la fase abierta de lectura de nsP4, y una delección en un gen de proteína no estructural); (b) una proteína de la cápside que deriva de dicho segundo alfavirus; y (c) una proteína de la envoltura que deriva de un alfavirus diferente de dicho primer alfavirus. En determinadas realizaciones, la proteína de la envoltura deriva del segundo alfavirus.

En cualquiera de las partículas quiméricas descritas en el presente documento, el ARN puede comprender, en sentido 5' a 3' (i) una secuencia 5' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural, (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica proteínas no estructurales de alfavirus, (iii) un medio para expresar un ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, un promotor de la región de unión vírica), (iv) la secuencia de ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, un inmunógeno), (v) una secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural y (vi) un tramo de poliadenilato. En determinadas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico heterólogo sustituye un gen de proteína estructural de alfavirus. Además, en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, las quimeras comprenden secuencias que derivan del virus Sindbis (SIN) y del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), en las que el primer alfavirus es VEE y el segundo alfavirus es SIN.

En otros aspectos, la invención incluye un ARN del replicón de alfavirus que comprende una secuencia 5' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural, secuencias que codifican proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas, un promotor subgenómico de alfavirus, una secuencia heteróloga que no es de alfavirus, y una secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural, en la que la secuencia que codifica al menos una de dichas proteínas no estructurales deriva de un alfavirus de Nivel de Bioseguridad 3 (NBS-3) y en el que las secuencias de dicho ARN del replicón presenta una identidad de secuencia de al menos un tercio pero no más de dos tercios de un genoma de un alfavirus NBS-3. En determinadas realizaciones, las copias de ADNc de estos replicones se incluyen como secuencias de vector de ácido nucleico en un vector del sistema eucariota de iniciación de vectores en capas (ELVIS, del inglés *Eukaryotic Layered Vector Initiation System*), por ejemplo, un vector de ELVIS que comprende un promotor 5' que es capaz de iniciar en una célula eucariota la síntesis de ARN a partir de ADNc, y la secuencia del vector de ácido nucleico que es capaz de

dirigir su propia replicación y de expresar una secuencia heteróloga. El alfavirus NBS-3 es un virus de la encefalitis equina venezolana (VEE).

5 En cualquiera de las partículas quiméricas y replicones descritos en el presente documento, el ARN puede comprender adicionalmente secuencias de ácido nucleico heterólogo, por ejemplo, un agente terapéutico o un inmutógeno (antígeno). La secuencia de ácido nucleico heterólogo puede sustituir las secuencias codificantes de la proteína estructural. Además, la secuencia de nucleótidos heteróloga puede codificar, por ejemplo, un antígeno de polipéptido que deriva de un patógeno (por ejemplo, un agente infeccioso tal como un virus, una bacteria, un hongo o un parásito). En realizaciones preferidas, el antígeno deriva de un virus de inmunodeficiencia humano (VIH) (por ejemplo, gag, gp 120, gp 140, gp 160 pol, rev, tat, y nef), de un virus de hepatitis C (VHC) (por ejemplo, C, E1, E2, NS3, NS4 y NS5), de un virus gripal (por ejemplo, HA, NA, NP, M), de un paramixovirus, tal como virus paragripal o virus sincicial respiratorio o virus del sarampión (por ejemplo, NP, M, F, HN, H), un herpesvirus (por ejemplo, glucoproteína B, glucoproteína D), un filovirus tal como virus de Marburgo o virus del ébola (por ejemplo, NP, GP), un bunyavirus tal como el virus Hantaan o el virus de la fiebre del valle del Rift (por ejemplo, G1, G2, N), o un flavivirus tal como el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas o el virus del Nilo Occidental (por ejemplo, C, prM, E, NS1, NS3, NS5). En cualquiera de las composiciones o procedimientos descritos en el presente documento, el ARN puede comprender adicionalmente una señal de empaquetamiento de un segundo alfavirus insertada en una región no esencial eliminada de un gen de proteína no estructural 3 (gen nsP3).

20 En otro aspecto, se proporcionan procedimientos, tal como se reivindica, de preparación (producción) de partículas de replicón de alfavirus. Las partículas se preparan introduciendo cualquiera de los ARN de replicón y auxiliares defectuosos, descritos en el presente documento, en una célula hospedadora adecuada en condiciones que permitan la formación de partículas. En cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los ARN auxiliares defectuosos pueden incluir proteínas estructurales quiméricas y/o híbridas (o secuencias que codifiquen estas proteínas quiméricas/híbridas) tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el procedimiento comprende introducir en una célula hospedadora: (a) un ARN de replicón de alfavirus tal como se reivindica, que contiene una o más secuencias heterólogas; y (b) al menos uno o más ARN auxiliares defectuosos distintos que codifican proteínas estructurales ausentes en el ARN de replicón, en el que al menos una de dichas proteínas estructurales deriva de dos o más alfavirus, en el que se producen partículas de replicón de alfavirus. El replicón de ARN puede derivar de uno o más alfavirus y las proteínas estructurales pueden incluir una o más proteínas híbridas, por ejemplo, una proteína de cápside híbrida que tiene un dominio de unión a ARN derivado de un primer alfavirus y un dominio de interacción de glucoproteína de envoltura que deriva de un segundo alfavirus; y/o una proteína de envoltura híbrida que tiene una porción de cola citoplasmática y una porción permanente, en la que la porción de cola citoplasmática deriva de un primer alfavirus y la porción permanente de dicha glucoproteína de envoltura deriva de uno o más alfavirus diferentes del primero.

35 En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento tal como se reivindica para producir partículas de replicón de alfavirus, que comprende introducir en una célula hospedadora (a) un ARN de replicón de alfavirus tal como se reivindica que codifica una o más proteínas no estructurales de un primer alfavirus, una señal de empaquetamiento que deriva de un segundo alfavirus, (por ejemplo, insertada en un sitio seleccionado del grupo que consiste en la unión de nsP3 con nsP4, siguiendo la fase abierta de lectura de nsP4, y una delección en un gen de proteína no estructural) y una o más secuencias heterólogas; y (b) al menos uno o más ARN auxiliares defectuosos distintos que codifican proteínas estructurales ausentes en el ARN de replicón, en el que al menos una de dichas proteínas estructurales es una proteína de cápside derivada de dicho segundo alfavirus, y al menos una de dichas proteínas estructurales es una proteína de envoltura derivada de un alfavirus diferente de dicho primer alfavirus.

45 La invención puede utilizar líneas celulares de empaquetamiento de alfavirus que comprenden uno o más casetes de expresión de proteína estructural que comprenden secuencias que codifican una o más proteínas estructurales, en las que al menos una de dichas proteínas estructurales deriva de dos o más alfavirus. En determinadas realizaciones, uno o más casetes de expresión de proteína estructural comprende copias de ADNc de un ARN auxiliar defectuoso y, opcionalmente, un promotor subgenómico de alfavirus. Además, en cualquiera de estas realizaciones, el ARN auxiliar defectuoso puede dirigir la expresión de una o más proteínas estructurales.

50 En otro aspecto más, se proporcionan procedimientos, tal como se reivindica, de producción de partículas de replicón víricas usando líneas celulares de empaquetamiento. Típicamente, los procedimientos comprenden introducir, en cualquiera de las líneas celulares de empaquetamiento de alfavirus descritas en el presente documento, cualquiera de los ARN de replicón de alfavirus descritos en el presente documento, en los que se produce una partícula de alfavirus que comprende una o más secuencias de ARN heterólogo. Por lo tanto, el ARN incluirá una inserción de señal de empaquetamiento derivada de un alfavirus diferente. En otras realizaciones, la célula de empaquetamiento comprende tres moléculas de ARN distintas, por ejemplo, una primera molécula de ARN auxiliar defectuoso codifica una o más proteínas estructurales de la cápside vírica, una segunda molécula de ARN auxiliar defectuoso codifica una o más glucoproteínas estructurales de la envoltura vírica y un tercer vector de ARN de replicón, tal como se reivindica, que comprende genes que codifican las proteínas de replicasa no estructurales y un gen heterólogo de interés sustituido para proteínas estructurales víricas, en las que al menos una de las moléculas de ARN incluye secuencias que derivan de dos o más alfavirus. Pueden hacerse modificaciones en una cualquiera o más de las moléculas de ácido nucleico distintas introducidas en la célula (por ejemplo, una célula de empaquetamiento) para generar partículas de replicón de alfavirus quimérico. Por ejemplo, se puede preparar un

primer ARN auxiliar defectuoso que tenga un gen que codifique una proteína de cápside híbrida tal como se describe en el presente documento. En una realización, la proteína de cápside híbrida tiene un dominio de unión a ARN que deriva de un primer alfavirus y un dominio de interacción con glucoproteína de un segundo alfavirus. En otras realizaciones, una construcción de vector replicón de ARN, tal como se reivindica, deriva de un primer alfavirus que tiene una señal de empaquetamiento de un segundo alfavirus, insertada, por ejemplo, en una región génica de la proteína estructural que está eliminada. Los primeros y segundos ARN auxiliares defectuosos tienen genes que codifican la proteína de la cápside o proteínas de la envoltura del segundo alfavirus. En otras realizaciones, se crea una partícula de replicón de alfavirus quimérico usando un primer ARN auxiliar defectuoso que codifica una proteína de la cápside (que deriva de un primer alfavirus que es el mismo que el virus de la fuente del vector replicón) y un segundo ARN auxiliar defectuoso que tiene un gen que codifica una glucoproteína de la envoltura híbrida que tiene un fragmento de cola citoplasmática del mismo alfavirus que la proteína de la cápside del primer ARN auxiliar y un "ectodominio" expuesto en la superficie de la glucoproteína derivada de un segundo alfavirus. El fragmento de la cola interacciona con la proteína de la cápside y da como resultado una partícula de replicón quimérica que tiene ARN y una cápside que deriva de un primer virus y una envoltura que deriva principalmente de un segundo virus.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento, tal como se reivindica, para producir partículas de replicón de alfavirus, que comprende introducir en una célula admisible, (a) cualquiera de los ARN de replicón de alfavirus descritos en el presente documento que comprenden elementos de control y secuencias codificantes de polipéptidos que codifican (i) proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas y (ii) una proteína heteróloga, y (b) uno o más ARN auxiliares defectuosos que comprenden elementos de control y secuencias codificantes de polipéptidos que codifican al menos una proteína estructural de alfavirus, pudiendo comprender los elementos de control, en sentido 5' a 3', una secuencia 5' requerida para la amplificación mediada por proteínas no estructurales, un medio para expresar las secuencias codificantes de polipéptidos y una secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteínas no estructurales y en el que adicionalmente uno o más de dichos elementos de control del replicón de ARN son diferentes de dichos elementos de control de ARN auxiliar defectuoso; e incubar dicha célula en condiciones adecuadas durante un tiempo suficiente para permitir la producción de partículas de replicón. En determinadas realizaciones, el ARN del replicón y dichos uno o más ARN auxiliares defectuosos comprenden adicionalmente una NTR 5' subgenómica. En otras realizaciones, la NTR 5' subgenómica del ARN del replicón es diferente de la NTR 5' subgenómica del ARN auxiliar defectuoso; la secuencia 5' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural del ARN del replicón es diferente de la secuencia 5' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural del ARN auxiliar defectuoso; la secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural del ARN del replicón es diferente de la secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural del ARN auxiliar defectuoso; y/o el medio de expresión de dichas secuencias codificantes de polipéptidos del ARN del replicón es diferente del medio de expresión de dichas secuencias codificantes de polipéptidos del ARN auxiliar defectuoso.

Por lo tanto, en cualquiera de las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento, las secuencias derivan de al menos dos alfavirus, incluyendo al menos el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) y el virus Sindbis (SIN).

En otros aspectos, se proporcionan procedimientos tal como se reivindica para producir partículas de replicón de alfavirus y reducir la probabilidad de generar virus de replicación competente (por ejemplo, virus de tipo silvestre) durante la producción de dichas partículas, que comprenden la introducción, en una célula admisible, de un ARN de replicón de alfavirus tal como se reivindica y uno o más ARN auxiliares defectuosos que codifican al menos una proteína estructural de alfavirus, y la incubación de dicha célula en condiciones adecuadas durante un tiempo suficiente para permitir la producción de partículas de replicón, en los que dicho ARN del replicón comprende una secuencia 5' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural, secuencias que, cuando se expresan, codifican proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas, un medio para expresar una o más secuencias heterólogas, una secuencia heteróloga que es un gen codificante de proteína, siendo dicho gen el gen próximo a 3' dentro del replicón, una secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural, un tramo de poliadenilato y, opcionalmente, una NTR 5' subgenómica; y en el que dicho ARN auxiliar defectuoso comprende una secuencia 5' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural, un medio para expresar una o más proteínas estructurales de alfavirus, un gen que codifica una proteína estructural de alfavirus, siendo dicho gen, el gen próximo a 3' dentro del replicón, una secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural, un tramo de poliadenilato y, opcionalmente, una NTR 5' subgenómica; y en el que dicho ARN del replicón difiere de al menos un ARN auxiliar defectuoso en al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en una secuencia 5' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural, un medio para expresar un gen próximo a 3', una NTR 5' subgenómica, y una secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural.

Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención resultarán obvios tras la referencia a la siguiente descripción detallada, a las figuras adjuntas y a diversas referencias expuestas en el presente documento que describen con más detalle determinados procedimientos o composiciones (por ejemplo, plásmidos, secuencias, etc.).

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra fragmentos de síntesis de genes del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) y sitios de

restricción usados para ensamblar un replicón del VEE.

La Figura 2 ilustra la síntesis basada en oligonucleótidos del fragmento 2 de la nsP del VEE. (SEQ ID NO 51 y SEQ ID NO 52).

5 La Figura 3 ilustra fragmentos de síntesis de genes del VEE y sitios de restricción usados para ensamblar genes de proteína estructural. La Figura 4 ilustra una proteína de cápside híbrida para la producción eficaz de partículas de alfavirus quiméricos del virus Sindbis (SIN)/VEE.

La Figura 5 ilustra la glucoproteína E2 híbrida para la producción eficaz de partículas de alfavirus SIN/VEE quiméricos.

10 La Figura 6 ilustra replicones de VEE con señal de empaquetamiento de SIN heteróloga para un empaquetamiento eficaz usando proteínas estructurales de SIN.

La Figura 7 ilustra la inserción de señal de empaquetamiento de SIN en nsP4/promotor de la región de unión truncada (tal como se usa en la quimera 1A creada de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención).

La Figura 8 ilustra la inserción de la señal de empaquetamiento de SIN en nsP4/promotor de la región de unión no truncada (tal como se usa en la quimera 1B creada de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención).

15 La Figura 9 ilustra la inserción de la quimera número 2 de empaquetamiento de SIN/VEE de la señal de empaquetamiento de SIN en una delección de un gen de proteína no estructural (nsP3).

La Figura 10 representa la inserción de la quimera número 3 de empaquetamiento de SIN/VEE de la señal de empaquetamiento de SIN en el extremo carboxilo de nsP3.

20 La Figura 11 representa la modificación de los extremos de nsP3/nsP4 para la señal de empaquetamiento de SIN.

La Figura 12 es una gráfica que muestra la inmunogenicidad de quimeras de partículas de replicón de alfavirus que expresan un antígeno de VIH.

Descripción detallada de la invención

25 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia de la materia. Tales técnicas se explican totalmente en las referencias. Véase, por ejemplo, Pharmaceutical Sciences, de Remington, 18ª Edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); y Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª Edición, 1989); Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997); Short Protocols in Molecular Biology, 4ª ed. (Ausubel y col. eds., 1999, John Wiley & Sons); Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream y col., eds., 1998, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton y Graham eds., 1997, SpringerVerlag); Peters y Dalrymple, Fields Virology (2ª ed), Fields y col. (eds.), B.N. Raven Press, Nueva York, NY.

35 Tal como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno(a)", "el" y "la" incluyen referencias en plural a menos que el contenido dicte claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una partícula" incluye una mezcla de dos o más de tales partículas.

Antes de exponer la invención, se exponen las definiciones de ciertos términos que se usarán en lo sucesivo en el presente documento.

40 Una molécula de "ácido nucleico" puede incluir, pero no se limita a, secuencias procariotas, ARNm eucariota u otro ARN, ADNc de ARNm eucariota u otro ARN, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (por ejemplo, de mamífero) e incluso secuencias de ADN sintético. La expresión también engloba secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases de ADN y ARN conocidos e incluye modificaciones tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservativas en la naturaleza), en la secuencia natural. Estas modificaciones pueden ser intencionadas, tales como a través de mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales. Las modificaciones de polinucleótidos pueden tener cualquiera de diversos efectos que incluyen, por ejemplo, facilitar la expresión del producto polipeptídico en una célula hospedadora.

50 Los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero de restos de aminoácido y no se limitan a una longitud mínima del producto. Por lo tanto, péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares, se incluyen dentro de la definición. En la definición se engloban tantoproteínas de longitud completa comoragmentos de las mismas. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para los fines de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservativas en la naturaleza), en la secuencia natural, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada.

55 Estas modificaciones pueden ser intencionadas, como a través de mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de hospedadores que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por PCR. Además, se pueden crear modificaciones que tengan uno o más de los siguientes efectos: reducir la toxicidad; facilitar el procesamiento celular (por ejemplo, secreción, presentación de antígeno, etc.); y facilitar la presentación a linfocitos B y/o a linfocitos T.

"Unido de manera operativa" se refiere a una disposición de los elementos en la que los componentes así descritos se configuran para que realicen su función habitual. Por lo tanto, un promotor dado unido de manera operativa a una secuencia codificante es capaz de efectuar la expresión de la secuencia codificante cuando están presentes las enzimas apropiadas. El promotor no necesita estar contiguo a la secuencia codificante, siempre que funcione para dirigir la expresión de la misma. Por lo tanto, por ejemplo, entre la secuencia promotora y la secuencia codificante puede haber secuencias intermedias transcritas pero no traducidas, y la secuencia promotora puede considerarse todavía "unida de manera operativa" a la secuencia codificante.

En la materia se conocen bien técnicas para determinar la "similitud" de secuencia de aminoácidos. En general, "similitud" significa la comparación exacta entre aminoácidos de dos o más polipéptidos en el lugar apropiado, en la que los aminoácidos son idénticos o poseen propiedades químicas y/o físicas similares, tales como carga o hidrofobicidad. El, así denominado, "porcentaje de similitud" se puede determinar después entre las secuencias de polipéptidos comparadas. En la materia se conocen técnicas para determinar la identidad de secuencia de ácidos nucleicos y de aminoácidos e incluyen la determinación de la secuencia de nucleótidos del ARNm para ese gen (normalmente mediante un intermediario de ADNc) y la determinación de la secuencia de aminoácidos codificada de ese modo, y la comparación de ésta con una segunda secuencia de aminoácidos. En general, "identidad" se refiere a una correspondencia exacta entre nucleótidos o aminoácidos de dos secuencias de polinucleótidos o de polipéptidos, respectivamente.

Se pueden comparar dos o más secuencias de polinucleótidos determinando su "porcentaje de identidad". Del mismo modo, se pueden comparar dos o más secuencias de aminoácidos determinando su "porcentaje de identidad". El porcentaje de identidad de dos secuencias, tanto de secuencias de ácido nucleico como de péptidos, se describe de manera general como el número de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas dividido entre la longitud de la secuencia más corta y multiplicado por 100. Se proporciona un alineamiento aproximado para secuencias de ácido nucleico mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981). Este algoritmo se puede extender para su uso con secuencias de péptidos usando la matriz de puntuación desarrollada por Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M.O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA, y normalizada por Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14(6):6745-6763 (1986). Se proporciona una implementación de este algoritmo para las secuencias de ácido nucleico y de péptidos por Genetics Computer Group (Madison, WI) en su aplicación de la herramienta BestFit. Los parámetros por defecto para este procedimiento se describen en el manual del programa del paquete de análisis de secuencias de Wisconsin, versión 8 (1995) (disponible en Genetics Computer Group, Madison, WI). En la materia se conocen en general otros programas también adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias.

Por ejemplo, se puede determinar el porcentaje de identidad de una secuencia de nucleótidos particular con una secuencia de referencia usando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuación por defecto y una penalización por hueco de seis posiciones de nucleótidos. Otro procedimiento para establecer el porcentaje de identidad en el contexto de la presente invención es usar el paquete de programas MPSRCH registrado por la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). Con este conjunto de paquetes, se puede emplear el algoritmo de Smith-Waterman en el que se usan parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización por apertura de hueco de 12, penalización por extensión de hueco de uno, y un hueco de seis). A partir de los datos generados, el valor "coincidencia" refleja la "identidad de secuencia". En la materia se conocen generalmente otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias, tal como el programa de alineamiento BLAST, que también se puede usar con parámetros por defecto. Por ejemplo, BLASTN y BLASTP se pueden usar con los siguientes parámetros por defecto: código genético = estándar; filtro = ninguno; cadena = ambas; corte = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciónes = 50 secuencias; ordenado por = MAYOR PUNTUACIÓN; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss protein + Spupdate + PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de internet: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

Un experto en la materia puede determinar fácilmente los parámetros de búsqueda apropiados para usarlos para una secuencia dada en los programas anteriores. Por ejemplo, los parámetros de búsqueda pueden variar basándose en el tamaño de la secuencia en cuestión. Por lo tanto, por ejemplo, una realización representativa de la presente invención podría incluir un polinucleótido aislado que tiene X nucleótidos contiguos, en el que (i) los X nucleótidos contiguos tienen al menos aproximadamente 50 % de identidad con Y nucleótidos contiguos derivados de cualquiera de las secuencias descritas en el presente documento, (ii) X es igual a Y y (iii) X es mayor o igual que 6 nucleótidos y hasta 5000 nucleótidos, preferentemente mayor o igual que 8 nucleótidos y hasta 5000 nucleótidos, más preferentemente 10-12 nucleótidos y hasta 5000 nucleótidos e incluso más preferentemente 15-20 nucleótidos, hasta el número de nucleótidos presente en las secuencias de longitud completa descritas en el presente documento (por ejemplo, véase el listado de secuencias y las reivindicaciones), incluyendo todos los valores enteros que están dentro de los intervalos descritos anteriormente.

Se considera que dos fragmentos de ácido nucleico "hibridan de manera selectiva" tal como se describe en el presente documento. El grado de identidad de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico afecta a la eficacia y a la fuerza de los eventos de hibridación entre tales moléculas. Una secuencia de ácido nucleico parcialmente

idéntica inhibirá, al menos parcialmente, la hibridación de una secuencia completamente idéntica con una molécula diana. La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente idéntica se puede evaluar usando ensayos de hibridación que son muy conocidos en la materia (por ejemplo, transferencia de Southern, transferencia de Northern, hibridación en solución, o similares, véase Sambrook, y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.). Tales ensayos se pueden llevar a cabo usando diversos grados de selectividad, por ejemplo, usando condiciones que varían desde una baja hasta una alta rigurosidad. Si se emplean condiciones de baja rigurosidad, la ausencia de unión no específica se puede evaluar usando una sonda secundaria que carezca incluso de un grado parcial de identidad de secuencia (por ejemplo, una sonda que tiene menos de aproximadamente 30 % de identidad de secuencia con la molécula diana), de tal manera que, en ausencia de eventos de unión no específica, la sonda secundaria no hibridará con la diana.

Cuando se utiliza un sistema de detección basado en hibridación, se elige una sonda de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia diana de ácido nucleico, y después, mediante la selección de condiciones apropiadas, la sonda y la secuencia diana "hibridan de manera selectiva", o se unen entre sí para formar una molécula híbrida. Una molécula de ácido nucleico que es capaz de hibridar de manera selectiva con una secuencia diana en condiciones "moderadamente rigurosas" hibrida típicamente en condiciones que permiten la detección de una secuencia diana de ácido nucleico de al menos aproximadamente 10-14 nucleótidos de longitud, que tiene al menos aproximadamente 70 % de identidad de secuencia con la secuencia de la sonda de ácido nucleico seleccionada. Las condiciones de hibridación rigurosa típicamente permiten la detección de secuencias de ácido nucleico diana de al menos 10-14 nucleótidos de longitud que tienen una identidad de secuencia de aproximadamente más de 90-95 % con la secuencia de la sonda de ácido nucleico seleccionada. Las condiciones de hibridación útiles para la hibridación de la sonda/diana en la que la sonda y la diana tienen un grado de identidad de secuencia específico, se pueden determinar tal como se conoce en la materia (véase, por ejemplo, *Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach*, editores B.D. Hames y S.J. Higgins, (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Press).

Con respecto a las condiciones de rigurosidad para la hibridación, es bien conocido en la materia que se pueden emplear numerosas condiciones equivalentes para establecer una rigurosidad particular variando, por ejemplo, los siguientes factores: la longitud y la naturaleza de la sonda y de las secuencias diana, la composición base de las diversas secuencias, las concentraciones de sales y de otros componentes de la solución de hibridación, la presencia o ausencia de agentes bloqueantes en las soluciones de hibridación (por ejemplo, formamida, sulfato de dextrano y polietilenglicol), parámetros de temperatura y tiempo de la reacción de hibridación, así como condiciones variables de lavado. La selección de un conjunto particular de condiciones de hibridación se selecciona siguiendo procedimientos convencionales en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook, y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición, (1989) Cold Spring Harbor, N.Y.).

La expresión "deriva de" se usa para identificar la fuente de la molécula de alfavirus (por ejemplo, polinucleótido, polipéptido). Un primer polinucleótido "deriva de" un segundo polinucleótido si tiene la misma o sustancialmente la misma secuencia de pares de bases que una región del segundo polinucleótido, su ADNc, complementos del mismo, o si presenta una identidad de secuencia como se describe anteriormente. Por lo tanto, una secuencia o un polinucleótido de alfavirus "deriva de" un alfavirus particular (por ejemplo, especie) si tiene (i) la misma o sustancialmente la misma secuencia que la secuencia de alfavirus o (ii) presenta una identidad de secuencia con polipéptidos de ese alfavirus como se describe anteriormente.

Un primer polipéptido "deriva de" un segundo polipéptido si (i) está codificado por un primer polinucleótido que deriva de un segundo polinucleótido, o (ii) presenta identidad de secuencia con los segundos polipéptidos como se describe anteriormente. Por lo tanto, un polipéptido (proteína) de alfavirus "deriva de" un alfavirus particular si (i) está codificado por una fase abierta de lectura de un polinucleótido de ese alfavirus (polinucleótido alfavírico), o (ii) presenta identidad de secuencia, tal como se ha descrito anteriormente, con polipéptidos de ese alfavirus.

Tanto las moléculas de polinucleótidos como las de polipéptidos pueden derivar físicamente del alfavirus o se pueden producir de manera recombinante o sintética, por ejemplo, basándose en secuencias conocidas.

Los "elementos de control" típicos, incluyen, pero no se limitan a, promotores de la transcripción, elementos potenciadores de la transcripción, señales de terminación de la transcripción, secuencias de poliadenilación (localizadas en 3' con respecto al codón de terminación de la traducción), secuencias para la optimización de la iniciación de la traducción (localizadas en 5' con respecto a la secuencia codificante), secuencias de terminación de la traducción, secuencia 5' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural, secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural, y medio para expresar una o más secuencias heterólogas (por ejemplo, promotor de la región de unión subgenómica), véase, por ejemplo, McCaughan y col. (1995) PNAS USA 92:5431-5435; Kochetov y col. (1998) FEBS Letts. 440:351-355. Un "vector replicón de ARN de alfavirus", "vector replicón de ARN", "vector replicón" o "replicón", se refiere a una molécula de ARN que es capaz de dirigir su propia amplificación o autorreplicación *in vivo*, en una célula diana. Para dirigir su propia amplificación, la molécula de ARN debe codificar la(s) polimerasa(s) necesaria(s) para catalizar la amplificación de ARN (por ejemplo, las proteínas de alfavirus no estructurales nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) y también contener secuencias de ARN en *cis* requeridas para la replicación que reconocen y utilizan la polimerasa (o polimerasas) codificada. Un vector replicón de ARN debe contener los siguientes elementos ordenados: secuencias 5' víricas o celulares requeridas para la amplificación mediada por proteína no estructural (también puede denominarse CSE 5' o secuencia 5' de replicación

en *cis*, o secuencias 5' víricas requeridas en *cis* para la replicación, o una secuencia 5' que es capaz de iniciar la transcripción de un alfavirus), secuencias que, cuando se expresan, codifican proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas (por ejemplo, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) y secuencias 3' víricas o celulares requeridas para la amplificación mediada por proteína no estructural (también puede denominarse CSE 3', o secuencias 3' víricas requeridas en *cis* para la replicación, o una secuencia de reconocimiento de ARN polimerasa de alfavirus). El vector replicón de ARN de alfavirus también debe contener un medio para expresar una o más secuencias heterólogas, tales como, por ejemplo, un IRES (del inglés *Internal Ribosome Entry Site*, sitio interno de entrada al ribosoma) o un promotor subgenómico vírico (por ejemplo, alfavirus) (por ejemplo, promotor de la región de unión) que puede, en ciertas realizaciones, modificarse para aumentar o reducir la transcripción del fragmento subgenómico vírico, o para disminuir la homología con casetes de expresión de proteínas estructurales o auxiliares defectuosas, y expresar una o más secuencias heterólogas. Un replicón también puede contener secuencias adicionales, por ejemplo, una o más secuencia heterólogas que codifican uno o más polipéptidos (por ejemplo, un gen codificante de proteína o un gen próximo a 3') y/o un tramo de poliadenilato.

"Partícula de alfavirus recombinante", Una "partícula de replicón de alfavirus" y una "partícula de replicón" se refieren a una unidad de tipo virión que contiene un vector replicón de ARN de alfavirus. Generalmente, la partícula de alfavirus recombinante comprende una o más proteínas estructurales de alfavirus, una envoltura lipídica y un vector replicón de ARN. Preferentemente, la partícula de alfavirus recombinante contiene una estructura de nucleocápside que está contenida dentro de la bicapa lipídica derivada de una célula hospedadora, tal como una membrana plasmática, en la que una o más glucoproteínas de envoltura alfavíricas (por ejemplo, E2, E1) están embebidas. La partícula también puede contener otros componentes (por ejemplo, elementos de direccionamiento tales como biotina, otras proteínas estructurales víricas o porciones de la misma, envolturas híbridas u otros ligandos de unión al receptor), que dirijan el tropismo de la partícula de la que derivó el alfavirus. Generalmente, la interacción entre el ARN del alfavirus y la(s) proteína(s) estructural(es) necesaria para formar de manera eficaz una partícula de replicón o nucleocápside, puede ser una interacción de ARN-proteína entre una proteína de la cápside y una señal de empaquetamiento (o secuencia de empaquetamiento) contenida en el ARN.

"Línea celular de empaquetamiento de alfavirus" se refiere a una célula que contiene uno o más casetes de expresión de proteína estructural de alfavirus y que produce partículas de alfavirus recombinante (partículas de replicón) tras la introducción de un vector replicón de ARN de alfavirus, un sistema eucariota de iniciación de vectores en capas o una partícula de alfavirus recombinante. La célula parental puede ser de origen mamífero o no mamífero. En realizaciones preferidas, la línea celular de empaquetamiento se transforma de manera estable con el/los casete(s) de expresión de proteína estructural.

Un "ARN auxiliar defectuoso" se refiere a una molécula de ARN que es capaz de amplificarse y expresar una o más proteínas estructurales de alfavirus en una célula eucariota, cuando esa célula también contiene proteínas "replicasas" no estructurales de alfavirus funcional. Las proteínas no estructurales de alfavirus pueden expresarse en la célula mediante un vector replicón de ARN de alfavirus u otros medios. Para permitir la amplificación y la expresión de una proteína estructural, mediada por proteínas no estructurales de alfavirus, la molécula de ARN auxiliar defectuosa debería contener las secuencias de ARN de los extremos 5' y 3' requeridas para la amplificación, que se reconocen y utilizan mediante las proteínas no estructurales, así como un medio para expresar una o más proteínas estructurales del alfavirus. Por lo tanto, un ARN auxiliar defectuoso de alfavirus debería contener los siguientes elementos ordenados: secuencias 5' víricas o celulares requeridas para la amplificación de ARN por proteínas no estructurales de alfavirus (también denominado en otras partes CSE 5' o secuencia 5' de replicación en *cis*, o secuencias 5' víricas requeridas en *cis* para la replicación, o secuencia 5' que es capaz de iniciar la transcripción de un alfavirus), un medio para expresar una o más proteínas estructurales de alfavirus, una o más secuencias génicas, que, cuando se expresan, codifican una o más proteínas estructurales de alfavirus (por ejemplo, C, E2, E1), secuencias 3' víricas o celulares requeridas para la amplificación mediante proteínas no estructurales de alfavirus (también denominadas CSE 3', o secuencias 3' víricas requeridas en *cis* para la replicación, o una secuencia de reconocimiento de ARN polimerasa de alfavirus), y preferentemente, un tramo de poliadenilato. Generalmente, el ARN auxiliar defectuoso no debería por sí mismo codificar o expresar en su totalidad las cuatro proteínas no estructurales del alfavirus (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4), pero puede codificar o expresar un subconjunto de estas proteínas o porciones de las mismas, o contener una o más secuencias derivadas de uno o más genes de proteína no estructural, pero que por la naturaleza de su inclusión en el auxiliar defectuoso no expresan una o más proteínas no estructurales o porciones de las mismas. Como un medio para expresar la proteína (o proteínas) estructural(es) del alfavirus, el ARN auxiliar defectuoso puede contener un promotor subgenómico vírico (por ejemplo, alfavirus) que puede, en ciertas realizaciones, modificarse para modular la transcripción del fragmento subgenómico, o para disminuir la homología con el ARN del replicón, o, de manera alternativa, otro medio para efectuar la expresión de la proteína estructural de alfavirus (por ejemplo, un sitio interno de entrada al ribosoma, un elemento de ultralectura ribosómica). Preferentemente, un gen de proteína estructural de alfavirus es el gen próximo a 3' dentro del auxiliar defectuoso. Además, también es preferente que el ARN auxiliar defectuoso no contenga secuencias que faciliten las interacciones ARN-proteína con una o más proteínas estructurales de alfavirus y el empaquetamiento en nucleocápsides, partículas de tipo virión o partículas de replicón de alfavirus. Un ARN auxiliar defectuoso es una representación específica de un casete de expresión de proteína estructural de alfavirus.

"Sistema eucariota de iniciación de vectores en capas" se refiere a un ensamblaje que es capaz de dirigir la expresión de una secuencia o gen de interés. El sistema eucariota de iniciación de vectores en capas debería

contener un promotor 5' que es capaz de iniciar *in vivo* (es decir, en una célula eucariota) la síntesis de ARN a partir de ADNc y una secuencia de vector de ácido nucleico (por ejemplo, vector vírico) que es capaz de dirigir su propia replicación en una célula eucariota y también expresar una secuencia heteróloga. Preferentemente, la secuencia de vector de ácido nucleico es una secuencia que deriva de alfavirus y que comprende secuencias 5' víricas o celulares requeridas para la amplificación mediada por proteína no estructural (también denominada CSE 5' o secuencia 5' de replicación en *cis*, o secuencias 5' víricas requeridas en *cis* para la replicación, o secuencia 5' que es capaz de iniciar la transcripción de un alfavirus), así como secuencias que, cuando se expresan, codifican proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas (por ejemplo, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) y secuencias 3' víricas o celulares requeridas para la amplificación mediada por proteína no estructural (también denominadas CSE 3', o secuencias 3' víricas requeridas en *cis* para la replicación, o una secuencia de reconocimiento de ARN polimerasa de alfavirus). Además, la secuencia del vector puede incluir un medio para expresar una o más secuencias heterólogas, tales como, por ejemplo, un promotor subgenómico vírico (por ejemplo, alfavirus) (por ejemplo, promotor de la región de unión) que puede, en ciertas realizaciones, modificarse para prevenir, aumentar o reducir la transcripción vírica del fragmento subgenómico, o para disminuir la homología con casetes de expresión de auxiliar defectuoso o de proteína estructural, y expresar una o más secuencias heterólogas. Preferentemente, la(s) secuencia(s) heteróloga(s) comprende(n) un gen codificante de proteína y dicho gen es el gen próximo a 3' dentro de la secuencia del vector. El sistema eucariota de iniciación de vectores en capas también podría contener una secuencia de poliadenilación, secuencias de reconocimiento de corte y empalme, una secuencia de procesamiento de ribozima catalítica, una señal de exportación nuclear y una secuencia de terminación de la transcripción. En determinadas realizaciones, la síntesis *in vivo* de la secuencia de ácido nucleico del vector a partir de ADNc se puede regular usando un promotor inducible o la expresión subgenómica puede ser inducible usando reguladores de la traducción o proteínas no estructurales modificadas.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "partícula de alfavirus quimérico" y "partícula de replicón de alfavirus quimérico" se refieren a una quimera o a una partícula quimérica, tal como un virus o una partícula de tipo virus, modificada o diseñada específicamente por ingeniería genética para contener un ácido nucleico derivado de un alfavirus distinto del alfavirus del que derivan la cápside y/o la glucoproteína de la envoltura (por ejemplo, de un virus diferente). En tal partícula, el ácido nucleico derivado de un alfavirus es una molécula de ARN que comprende una de diversas longitudes diferentes, incluyendo, pero sin limitarse, la longitud del genoma (que codifica proteínas no estructurales y estructurales) y la longitud del replicón (eliminada de una o más proteínas estructurales). Por ejemplo, y sin pretender que sea una limitación, las partículas de replicón quimérico incluyen ARN replicón del virus Sindbis (SIN) dentro de una cápside que tiene un dominio de unión a ARN del virus Sindbis y un dominio de interacción con glucoproteína de la envoltura del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), rodeado por una envoltura de glucoproteína del VEE.

La expresión "gen próximo a 3'" se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, que está contenida en un vector replicón, un sistema eucariota de iniciación de vectores en capas, un ARN auxiliar defectuoso o un casete de expresión de proteína estructural, y localizado dentro de una posición específica en relación con otro elemento. La posición de este gen próximo a 3' debería determinarse con respecto a la secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural (definida anteriormente), en la que el gen próximo a 3' es la secuencia 5' codificante de proteína (aguas arriba) de, e inmediatamente anterior a, este elemento. El gen próximo a 3' generalmente es una secuencia heteróloga (por ejemplo, un gen que codifica un antígeno) cuando se refiere a un vector replicón o a un sistema eucariota de iniciación de vectores en capas o, como alternativa, generalmente es un gen de proteína estructural (por ejemplo, C, E2, E1 de alfavirus) cuando se refiere a un ARN auxiliar defectuoso o a un casete de expresión de proteína estructural.

La expresión "secuencias 5' víricas o celulares requeridas para la amplificación mediada por proteína no estructural" o "secuencias 5' requeridas para la amplificación mediada por proteína no estructural" se refieren a un elemento funcional que proporciona un sitio de reconocimiento en el que el virus o el vector derivado del virus sintetiza un ARN de cadena positiva. Por lo tanto, es el complemento de la secuencia real contenida en el virus o vector, el que se corresponde con el extremo 3' de la copia de ARN de cadena negativa, que se une mediante el complejo de proteínas replicasa no estructurales, y posiblemente factores de célula hospedadora adicionales, a partir del cual se inicia la transcripción del ARN de cadena positiva. Para esta función se puede utilizar una amplia variedad de secuencias. Por ejemplo, la secuencia puede incluir la región no traducida (NTR) del extremo 5' del alfavirus y otras secuencias adyacentes, tales como, por ejemplo, secuencias a través de los nucleótidos 210, 250, 300, 350, 400 o 450. Como alternativa, se pueden utilizar secuencias que no son de alfavirus u otras secuencias como este elemento, mientras se mantenga una capacidad funcional similar, por ejemplo, en el caso del SIN, los nucleótidos 10-75 para la asparagina del ARNt (Schlesinger y col., Patente de Estados Unidos N.º 5.091.309). La expresión se usa de manera indistinta con las expresiones CSE 5' o secuencias 5' víricas requeridas en *cis* para la replicación, o secuencia 5' que es capaz de iniciar la transcripción de un alfavirus.

La expresión "promotor subgenómico vírico" se refiere a una secuencia de origen vírico que, junto con la(s) polimerasa(s) vírica(s) y celular(es) y otros factores, permite la transcripción de una molécula de ARN de una longitud menor a la del genoma. Para un promotor subgenómico de alfavirus (alfavírico) o un promotor de la región de unión subgenómica del alfavirus (alfavírica), esta secuencia deriva generalmente de la región entre las fases abiertas de lectura (ORF, del inglés, *open reading frames*) de proteínas no estructurales y estructurales y controla normalmente la transcripción del ARNm subgenómico. Típicamente, el promotor subgenómico de alfavirus consiste

en una secuencia núcleo que proporciona la mayoría de la actividad asociada al promotor, así como regiones flanqueantes (por ejemplo, promotor extendido o natural) que mejora adicionalmente la actividad asociada al promotor. Por ejemplo, en el caso del prototipo de alfavirus, virus Sindbis, el promotor de la región de unión subgenómica normal comienza típicamente en aproximadamente el nucleótido número 7579 y continúa hasta al menos el nucleótido número 7612 (y posiblemente más allá). Como mínimo, se cree que los nucleótidos 7579 a 7602 sirven como la secuencia núcleo necesaria para la transcripción del fragmento subgenómico.

Las expresiones "secuencias 3' víricas o celulares requeridas para la amplificación mediada por proteína no estructural" o "secuencias 3' requeridas para la amplificación mediada por proteína no estructural", se usan de manera indistinta con las expresiones CSE 3', o secuencias 3' de replicación en *cis*, o secuencias 3' víricas requeridas en *cis* para la replicación, o una secuencia de reconocimiento de ARN polimerasa de alfavirus. Esta secuencia es un elemento funcional que proporciona un sitio de reconocimiento en el que el virus o el vector derivado del virus, comienza la replicación (amplificación) a través de la síntesis del ARN de cadena negativa. Para esta función puede utilizarse una amplia variedad de secuencias. Por ejemplo, la secuencia puede incluir una región no traducida (NTR) completa del extremo 3' del alfavirus, tal como, por ejemplo, con SIN, que incluiría los nucleótidos 11.647 a 11.703, o una región truncada de la NTR 3', que aun conserva la función como una secuencia de reconocimiento (por ejemplo, los nucleótidos 11.684 a 11.703). Otros ejemplos de secuencias que se pueden utilizar en este contexto incluyen, pero no se limitan a, secuencias que no son de alfavirus u otras secuencias que conservan una capacidad funcional similar para permitir la iniciación de la síntesis del ARN de cadena negativa (por ejemplo, las secuencias descritas en George y col., (2000) J. Virol. 74:9776-9785).

Un "antígeno" se refiere a una molécula que contiene uno o más epítomos (lineales, conformacionales o ambos) que estimularán el sistema inmunitario de un hospedador para generar una respuesta humoral y/o celular específica de antígeno. El término se usa de manera indistinta con el término "inmunógeno". Normalmente, un epítomo incluirá entre aproximadamente 3-15, de manera general, aproximadamente 5-15 aminoácidos. Normalmente, un epítomo de linfocito B tiene aproximadamente 5 aminoácidos, pero puede ser tan pequeño como de 3-4 aminoácidos. Un epítomo de linfocitos T, tal como un epítomo de CTL, incluirá al menos aproximadamente 7-9 aminoácidos, y un epítomo de linfocito Tauxiliar al menos aproximadamente 12-20 aminoácidos. Normalmente, un epítomo incluirá entre aproximadamente 7 y 15 aminoácidos, tal como, 9, 10, 12 o 15 aminoácidos. El término "antígeno" indica tanto antígenos subunitarios, (es decir, antígenos que están separados y aislado de un organismo completo con el que se asocia el antígeno en la naturaleza), así como bacterias, virus, hongos, parásitos u otros microbios, destruidos, atenuados o desactivados, así como antígenos tumorales, incluyendo dominios extracelulares de receptores de la superficie celular y porciones intracelulares que pueden contener epítomos de linfocitos T. Los anticuerpos, tales como anticuerpos anti-idiotípicos o fragmentos de los mismos y los mimotopos de péptidos sintéticos, que pueden imitar a un antígeno o determinante antigénico, también se engloban en la definición de antígeno tal como se usa en el presente documento. De forma similar, un oligonucleótido o polinucleótido que expresa *in vivo* un antígeno o determinante antigénico, tal como en terapia génica y en aplicaciones de inmunización de ADN, también se incluye en la definición de antígeno del presente documento.

Los epítomos de una proteína dada se pueden identificar usando cualquiera de las diversas técnicas de mapeo epitópico, bien conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, los epítomos lineales se pueden determinar, por ejemplo, sintetizando simultáneamente grandes números de péptidos en soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a porciones de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras que los péptidos todavía están unidos a los soportes. Tales técnicas son conocidas en la materia y se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. n.º 4.708.871; Geysen y col. (1984) Proc. Nat'l Acad Sci. USA 81:3998-4002; Geysen y col. (1986) Molec. Immunol 23:709-715.

De forma similar, los epítomos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de aminoácidos, tal como, por ejemplo, mediante cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols*, anteriormente citado.

Para los fines de la presente invención, los antígenos pueden derivar de tumores y/o de cualquiera de los diversos virus, bacterias, parásitos y hongos conocidos, tal como se describe de manera más completa a continuación. El término también se refiere a cualquiera de los diversos antígenos tumorales o a cualquier otro antígeno para el que se desea una respuesta inmunitaria. Además, para los fines de la presente invención, un "antígeno" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservativas en la naturaleza), en la secuencia natural, siempre que la proteína conserve la capacidad de provocar una respuesta inmunológica, tal como se define en el presente documento. Estas modificaciones pueden ser intencionadas, como a través de mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de hospedadores que producen los antígenos.

Una "respuesta inmunológica" a un antígeno o composición es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular a un antígeno presente en la composición de interés. Para los fines de la presente invención, una "respuesta inmunitaria humoral" se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por moléculas de anticuerpo, incluyendo moléculas secretoras (IgA) o de IgG, mientras que una "respuesta inmunitaria celular" es una mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una

respuesta específica de antígeno mediante linfocitos T citolíticos ("CTL"). Los CTL tienen especificidad por los antígenos del péptido que están presentes en asociación con proteínas codificadas por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés, *major histocompatibility complex*) y expresadas en las superficies de las células. Los CTL ayudan a inducir y promover la destrucción de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno mediante linfocitos T auxiliares. Los linfocitos T auxiliares actúan para ayudar a estimular la función, y se centran en la actividad de, células efectoras no específicas frente a células presentadoras de antígenos del péptido en asociación con moléculas del MHC en su superficie. Una "respuesta inmunitaria celular" también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras moléculas de este tipo, producidas por linfocitos T activados y/u otros glóbulos blancos, incluyendo aquellos derivados de linfocitos T CD4+ y CD8+. Además, se puede inducir una respuesta de quimiocinas mediante varios glóbulos blancos o células endoteliales en respuesta a un antígeno administrado.

Una composición o vacuna que provoca una respuesta inmunitaria celular puede servir para sensibilizar a un sujeto vertebrado presentando un antígeno asociado con moléculas del MHC en la superficie celular. La respuesta inmunitaria mediada por células se dirige a, o cerca de, células presentadoras de antígeno en su superficie. Además, se pueden generar linfocitos T específicos de antígeno para permitir la futura protección de un hospedador inmunizado.

La capacidad de un antígeno particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células se puede determinar mediante diversos ensayos, tales como mediante ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de linfocitos T citotóxicos, CTL, o mediante ensayos de linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado. Tales ensayos son muy conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Erickson y col., J. Immunol. (1993) 151:4189-4199; Doe y col., Eur. J. Immunol. (1994) 24:2369-2376. Los procedimientos actuales de medición de respuesta inmunitaria mediada por células incluyen la medición de citocinas intracelulares o la secreción de citocina por poblaciones de linfocitos T (por ejemplo, mediante la técnica de ELISPOT), o midiendo linfocitos T específicos de epitopo (por ejemplo, mediante la técnica de tetramero)(revisada por McMichael, A. J. y O'Callaghan, C.A., J. Exp. Med. 187(9):1367-1371,1998; Mcheyzer-Williams, M.G., y col., Immunol. Rev. 150: 5-21,1996; Lalvani, A., y col., J. Exp. Med. 186:859-865, 1997).

Por lo tanto, una respuesta inmunológica tal como se usa en el presente documento puede ser una que estimula los CTL y/o la producción o activación de los linfocitos T auxiliares. La producción de quimiocinas y/o citocinas también se puede estimular. El antígeno de interés también puede provocar una respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos. De este modo, una respuesta inmunológica puede incluir uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos (por ejemplo, IgA o IgG) mediante linfocitos B; y/o la activación de linfocitos T supresores, citotóxicos o auxiliares y/o (* linfocitos T dirigidos de manera específica a un antígeno o a antígenos presentes en la composición o vacuna de interés. Estas respuestas pueden servir para neutralizar la infectividad y/o mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, del inglés, *antibody dependent cell cytotoxicity*) del complemento o anticuerpos para proporcionar protección a un hospedador inmunizado. Tales respuestas se pueden determinar usando inmunoensayos y ensayos de neutralización convencionales, bien conocidos en la materia.

Una "composición inmunogénica" es una composición que comprende una molécula antigénica (o secuencia de nucleótidos que codifica una molécula antigénica) en la que la administración de la composición a un sujeto da como resultado el desarrollo en el sujeto de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular y/o mucosa contra la molécula antigénica de interés. La composición inmunogénica se puede introducir directamente en un sujeto receptor, tal como mediante inyección, inhalación, administración oral, intranasal o cualquier otra vía de administración parenteral o mucosa (por ejemplo, intrarrectal o intravaginal).

Con "vacuna subunitaria" se pretende indicar una composición de vacuna que incluye uno o más antígenos seleccionados, pero no todos los antígenos, derivados de u homólogos de, un antígeno de un patógeno de interés tal como un virus, una bacteria, un parásito o un hongo. Tal composición carece sustancialmente de células patógenas intactas o partículas patógenas o del lisado de tales células o partículas. Por lo tanto, una "vacuna subunitaria" se puede preparar a partir de al menos polipéptidos inmunogénicos al menos parcialmente purificados (preferentemente purificados de manera sustancial) del patógeno, o análogos del mismo. Por tanto, el procedimiento de obtención de un antígeno incluido en la vacuna subunitaria puede incluir técnicas de purificación, de producción recombinante, o de producción sintética convencionales.

1.0.Introducción

Se están desarrollando varios miembros del género *Alphavirus* como sistemas de administración de genes para vacunas y otras aplicaciones terapéuticas (Schlesinger y Dubensky, Curr. Opin. Biotechnol., 10:434-9 1999). La configuración de "replicón" típica de construcciones de vectores de alfavirus, tal como se describe en más detalle anteriormente y en los documentos US 5789245, 5843723, 5814482, 6015694 y WO 00/61772, comprende una secuencia 5' que inicia la transcripción de ARN de alfavirus, una secuencia de nucleótidos que codifica proteínas no estructurales de alfavirus, un promotor de región de unión subgenómica vírica que dirige la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga adyacente, una secuencia de reconocimiento de ARN polimerasa y preferentemente un tramo de poliadenilato. En la materia también se conoce otra terminología para definir los

mismos elementos.

A menudo, para vacuna *in vivo* y aplicaciones terapéuticas, el vector replicón de ARN de alfavirus o el ARN del replicón se empaqueta en primer lugar en una partícula de tipo virus, que comprende las proteínas estructurales del alfavirus (por ejemplo, proteína de la cápside y glucoproteínas de la envoltura). Debido a su configuración, los vectores replicones no expresan estas proteínas estructurales de alfavirus necesarias para el empaquetamiento en partículas de replicón de alfavirus recombinante. Por lo tanto, para generar partículas de replicón, las proteínas estructurales se deben proporcionar en *trans*. El empaquetamiento se puede lograr mediante una variedad de procedimientos, incluyendo enfoques transitorios tales como la cotransfección de replicón transcrito *in vitro* y ARN auxiliares defectuosos (Liljestrom, *Bio/Technology* 9:1356-1361, 1991; Bredenbeek y col., *J. Virol.* 67:6439-6446, 1993; Frolov y col., *J. Virol.* 71:2819-2829, 1997; Pushko y col., *Virology* 239:389-401, 1997; las Patentes de Estados Unidos 5.789.245 y 5.842.723) o construcciones de replicones y auxiliares defectuosos basados en ADN del plásmido (Dubensky y col., *J. Virol.* 70:508-519, 1996), así como la introducción de replicones de alfavirus en líneas celulares de empaquetamiento (PCL, del inglés, *packaging cell lines*) estables (Polo y col., *PNAS* 96:4598-4603, 1999; las Patentes de Estados Unidos 5.789.245, 5.842.723, 6.015.694; los documentos WO 9738087 y WO 9918226).

Las metodologías de empaquetamiento en *trans* permiten la modificación de uno o más genes de proteína estructural (por ejemplo, para incorporar secuencias de variantes de alfavirus tales como mutantes atenuados, documentos US 5.789.245, 5.842.723, 6.015.694), seguido de la posterior incorporación de la proteína estructural modificada en las partículas de replicón finales. Además, tal empaquetamiento permite la modificación global de las partículas de replicón de alfavirus mediante el empaquetamiento de una construcción de vector o ARN del replicón a partir de un primer alfavirus usando proteínas estructurales de un segundo alfavirus diferente del de la construcción del vector (documento WO 95/07994; Polo y col., 1999, *ibid*; Gardner y col., *J. Virol.*, 74:11849-11857, 2000). Este enfoque proporciona un mecanismo que aprovecha las propiedades deseables de múltiples alfavirus en una única partícula de replicón. Por ejemplo, aunque todos los alfavirus son generalmente bastante similares en sus mecanismos de replicación y estructura de virión, los diversos miembros del género *Alphavirus* pueden mostrar algunas diferencias únicas en sus propiedades biológicas *in vivo* (por ejemplo, tropismo para células linfoides, sensibilidad al interferón, y perfil de enfermedad). Además, diversos alfavirus se clasifican como organismos de Nivel de Bioseguridad 3 (NBS-3), lo que supone un problema para las instalaciones de producción de las partículas (por ejemplo, fabricación) y posible uso humano, mientras que otros se clasifican como Nivel de Bioseguridad 2 (NBS-2). Las quimeras de partículas de replicón de alfavirus proporcionan un mecanismo para incluir propiedades particulares de un alfavirus de nivel NBS-3 en una partícula de replicón derivada de un virus de nivel NBS-2. Por ejemplo, los elementos del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) linfotrópico de NBS-3 se pueden incorporar dentro de un virus linfotrópico no natural de NBS-2 (por ejemplo, el virus Sindbis).

Sin embargo, hasta la fecha, ha habido un éxito limitado en la producción eficaz y rutinaria de preparaciones de alto título aceptables de manera comercial de partículas de alfavirus quiméricas. Tales partículas de alfavirus quimérico son deseables por varias razones que incluyen tropismos específicos o especificidad tisular, antigenicidad superficial alterada y reconocimiento alterado por el hospedador. En este sentido, el sistema inmunitario de un animal generalmente reconoce antígenos de superficie del virus, tales como las glucoproteínas de la envoltura, y dirige respuestas celulares y humorales específicas contra ellos mucho antes de que los antígenos víricos internos, tales como las proteínas de la cápside, se expongan al sistema inmunitario. En consecuencia, si un receptor de partícula de replicón tiene anticuerpos preexistentes dirigidos contra los antígenos de superficie del vector (un hospedador sensibilizado), la partícula del replicón se puede atacar y destruir antes de que se pueda administrar su carga útil terapéutica al tejido diana. Dado que muchas de las partículas de replicón más satisfactorias derivan de virus infecciosos de origen natural, es probable que, al menos algunos posibles receptores de partícula de replicón, hayan estado previamente expuestos a, y hayan desarrollado respuestas inmunitarias contra, antígenos de superficie que son comunes entre la partícula de replicón y el virus infeccioso natural. La probabilidad de una respuesta inmunitaria adversa también aumenta con múltiples administraciones. Por lo tanto, con el fin de reducir o eliminar esta posibilidad, se pueden crear partículas de replicón de administración de genes posteriores usando partículas de replicón quiméricas de manera que el receptor no vea las mismas proteínas estructurales muchas veces.

En el presente documento se describen partículas de alfavirus quimérico que presentan interacciones estructurales eficaces. Por lo tanto, la presente invención proporciona composiciones y procedimientos para construir y obtener partículas de alfavirus quimérico recombinantes con eficacias de empaquetamiento/producción aumentadas de manera significativa, usando quimeras SIN/VEE tal como se reivindica.

Las ventajas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, (i) proporcionar partículas de alfavirus quimérico a niveles comercialmente viables; (ii) la capacidad de reducir la probabilidad de ocurrencia de eventos indeseables, por ejemplo, la recombinación y/o el empaquetamiento de un gen estructural; (iii) proporcionar vehículos de administración de genes con tropismos tisulares y celulares específicos (por ejemplo, administración de una célula presentadora de antígeno tal como una célula dendrítica).

Las enseñanzas proporcionadas en el presente documento permiten a un experto en la materia construir partículas de alfavirus quimérico derivadas de una amplia variedad de diferentes alfavirus, particularmente cuando las secuencias de tales alfavirus ya se han publicado. Los sistemas eucariotas de iniciación de vectores en capas

(ELVIS) también se pueden diseñar usando estas composiciones quiméricas. Optimizando los niveles de empaquetamiento tal como se desvela en el presente documento, se pueden producir partículas de replicón quimérico para su uso en diversas aplicaciones, incluyendo en aplicaciones para vacunas y terapéuticas.

2.0.0. Partículas y replicones de alfavirus

5 Como se ha indicado anteriormente, las partículas quiméricas tal como se describe en el presente documento incluyen una o más secuencias de polinucleótidos (por ejemplo, ARN). Cuando se encuentran en partículas, estos polinucleótidos están rodeados por (e interaccionan con) una o más proteínas estructurales. En el presente documento se describen ejemplos no limitantes de secuencias de polinucleótidos y proteínas estructurales que se pueden usar en la práctica de la invención.

10 2.1.0. Componentes nucleotídicos

Las partículas, los vectores y los replicones descritos en el presente documento incluyen típicamente una variedad de secuencias de ácido nucleico, tanto secuencias codificantes como no codificantes. Será evidente que las composiciones quiméricas descritas en el presente documento generalmente comprenden menos de un genoma de alfavirus completo (por ejemplo, contienen menos de todas las secuencias codificantes y/o no codificantes contenidas en un genoma de un alfavirus).

Además, cabe destacar que, para la ilustración en la presente memoria de diversos elementos útiles en la presente invención, se ha considerado que las secuencias de alfavirus de un virus heterólogo derivan de un alfavirus diferente del alfavirus que es la fuente de proteínas no estructurales usado en el replicón a empaquetar, independientemente de si el elemento que se está utilizando está en el replicón o en el ARN auxiliar defectuoso (por ejemplo, durante la producción de partículas, cuando ambos están presentes).

2.1.1. Componentes de polinucleótidos no codificantes

Las partículas quiméricas y los replicones descritos en el presente documento típicamente contienen secuencias que codifican para polipéptidos (por ejemplo, estructurales o no estructurales) así como secuencias no codificantes, tales como elementos de control. Los ejemplos no limitantes de secuencias no codificantes incluyen secuencias 5' requeridas para la amplificación mediada por proteína no estructural, un medio para expresar un gen próximo a 3', región no traducida subgenómica del extremo 5' de ARNm (NTR 5' subgenómica) y secuencias 3' requeridas para la amplificación mediada por proteína no estructural (Patentes de Estados Unidos 5.843.723; 6.015.694; 5.814.482; Publicaciones PCT WO 97/38087; WO 00/61772). Será evidente a partir de las enseñanzas del presente documento que una, más de una o todas las secuencias descritas en el presente documento se pueden incluir en las partículas, vectores y/o replicones descritos en el presente documento y, además, que una o más de estas secuencias se puede modificar o manipular de otro modo de acuerdo con las enseñanzas del presente documento.

Por lo tanto, los polinucleótidos descritos en el presente documento típicamente incluyen una secuencia 5' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural. Los ejemplos no limitantes de secuencias 5' adecuadas incluyen elementos de control tales como el extremo 5' de un alfavirus natural de un virus homólogo, el extremo 5' de un alfavirus natural de un virus heterólogo, el extremo 5' de un alfavirus DI no natural de un virus homólogo, el extremo 5' de un alfavirus DI no natural de un virus heterólogo, la secuencia vírica no derivada de un alfavirus (por ejemplo, togavirus, virus de planta), secuencia derivada de ARN celular (por ejemplo, elemento de ARNt) (por ejemplo, Monroe y col., PNAS 80:3279-3283, 1983), mutaciones/delecciones de cualquiera de las secuencias anteriores para reducir la homología (véase, por ejemplo, Niesters y col., J. Virol. 64:4162-4168, 1990; Niesters y col., J. Virol. 64:1639-1647, 1990), y/o secuencia 5' mínima en auxiliares (para aproximadamente 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos).

Las secuencias de polinucleótidos también incluyen generalmente un medio para expresar un gen próximo a 3' (por ejemplo, una secuencia heteróloga, una secuencia que codifica polipéptido). Los ejemplos no limitantes de tales medios incluyen elementos de control tales como promotores y similares, por ejemplo, un promotor subgenómico de alfavirus natural de un virus homólogo, un promotor subgenómico de alfavirus natural de un virus heterólogo, un promotor subgenómico de alfavirus del núcleo (homólogo o heterólogo), secuencias mínimas aguas arriba o aguas abajo del promotor subgenómico del núcleo, mutaciones/delecciones/adiciones del promotor subgenómico natural o del núcleo, un promotor subgenómico compatible no derivado de un alfavirus (por ejemplo, virus de planta), un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) y/o un elemento de ultralectura ribosómica (por ejemplo, BIP).

50 Las regiones adecuadas no traducidas del extremo 5' de ARNm subgenómico (NTR 5' subgenómico) incluyen, pero no se limitan a, una NTR 5' subgenómica de alfavirus natural de un virus homólogo, una NTR 5' subgenómica de alfavirus natural de un virus heterólogo, una NTR 5' vírica no derivada de alfavirus (por ejemplo, virus de planta), una NTR 5' derivada de un gen celular (por ejemplo, β -globina), y/o secuencias que contienen mutaciones, delecciones y/o adiciones a la NTR 5' subgenómica del alfavirus natural.

55 Los ejemplos no limitantes de secuencias 3' adecuadas requeridas para la amplificación mediada por proteína no estructural incluyen elementos de control tales como un extremo 3' de alfavirus natural de un virus homólogo, un extremo 3' de alfavirus natural de un virus heterólogo, un extremo 3' de alfavirus DI no nativo de un virus homólogo,

un extremo 3' de alfavirus DI no nativo de un virus heterólogo, una secuencia vírica no derivada de alfavirus (por ejemplo, togavirus, virus de planta), una secuencia derivada de ARN celular, secuencias que contienen mutaciones, deleciones o adiciones de secuencias anteriores para reducir la homología (véase, *por ejemplo*, Kuhn y col. (1990) J. Virol. 64:1465-1476), secuencia mínima en auxiliares hasta aprox. (20, 30, 50, 100, 200 nucleótidos) y/o secuencias CSE alfavíricas de 3' reparadas en la célula. También se puede incorporar una secuencia de poliadenilación, por ejemplo, dentro de las secuencias del extremo 3'. (Véase, por ejemplo, George y col. (2000) J. Virol. 74:9776-9785).

2.1.2.Secuencias codificantes

Las composiciones descritas en el presente documento también pueden incluir una o más secuencias que codifican varios polipéptidos de alfavirus, por ejemplo, uno o más de los polipéptidos no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) o estructurales (por ejemplo, cápside, envoltura) del alfavirus.

Tal como se describe en Strauss y col. (1984), anteriormente citado, un genoma de SIN de tipo silvestre tiene una longitud de 11.703 nucleótidos, excluyendo el casquete 5' y el tramo poli(A) del extremo 3'. Después del casquete del extremo 5', hay 59 nucleótidos de ácido nucleico en 5' no traducido seguido de una fase de lectura de 7539 nucleótidos que codifica los polipéptidos no estructurales y que está abierta excepto por un solo codón de terminación ópalo. Después de las 48 bases no traducidas localizadas en la región de unión que separa las secuencias que codifican proteínas estructurales y no estructurales, hay una fase de lectura abierta de 3735 nucleótidos de longitud que codifica las proteínas estructurales. Finalmente, la región no traducida 3' tiene una longitud de 322 nucleótidos. Las proteínas no estructurales se traducen a partir del ARN genómico como dos precursores de poliproteína. El primero incluye nsP1, nsP2 y nsP3 y tiene una longitud de 1896 aminoácidos y termina en un codón ópalo en la posición 1897. La cuarta proteína no estructural, nsP4, se produce cuando la ultralectura del codón ópalo produce un segundo precursor de poliproteína de 2513 aminoácidos de longitud, que después se escinde de manera postraduccional.

Los límites aproximados que definen los genes de proteína no estructural a partir de los genomas de tres alfavirus representativos y comúnmente usados, SIN, SFV y VEE son los siguientes.

	SIN ¹	SFV ²	VEE ³
nsP1 (límites aprox. de nucleótidos)	60-1679	86-1696	45-1649
nsP1 (límites aprox. de nucleótidos)	1-540	1-537	1-535
nsP2 (límites aprox. de nucleótidos)	1680-4100	1697-4090	1650-4031
nsP2 (límites aprox. de nucleótidos)	541-1347	538-1335	536-1329
nsP3 (límites aprox. de nucleótidos)	4101-5747	4191-5536	4032-5681
nsP3 (límites aprox. de nucleótidos)	1348-1896	1336-1817	1330-1879
nsP4 (límites aprox. de nucleótidos)	5769-7598	5537-7378	5703-7523
¹ Strauss y col. (1984) Virology 133:92-110 ² Takkinen (1986) Nucleic Acids Res. 14:5667-5682 ³ Kinney y col. (1989) Virology 170:19			

Un genoma de alfavirus de tipo silvestre también incluye secuencias que codifican proteínas estructurales. En SIN, las proteínas estructurales se traducen a partir de un mensaje subgenómico que comienza en el nucleótido 7598, es de 4106 nucleótidos de longitud (excluyendo el tramo poli(A)) y es coterminal con el extremo 3' del ARN genómico. Como las proteínas no estructurales, las proteínas estructurales también se traducen como un precursor de poliproteína que se escinde para producir una proteína de nucleocápside y dos glucoproteínas integrales de la membrana así como dos pequeños péptidos no presentes en el virión maduro. Por lo tanto, los replicones, partículas y vectores de la presente invención incluyen secuencias derivadas de uno o más secuencias codificantes de uno o más alfavirus, tal como se reivindica.

Además de proporcionar secuencias derivadas de regiones codificantes de alfavirus, la presente invención también proporciona vectores replicones de alfavirus que contienen secuencias que codifican proteínas modificadas de alfavirus, por ejemplo, proteínas no estructurales modificadas para reducir su propensión a transferirse entre cadenas (por ejemplo, recombinación) entre el replicón y el ARN auxiliar defectuoso o entre dos ARN auxiliares defectuosos, durante la síntesis de la cadena positiva de ARN, la síntesis de ARN de la cadena negativa, o ambas. Tales modificaciones pueden incluir, pero no se limitan a mutaciones de nucleótidos, deleciones, adiciones o sustituciones de secuencia, en su totalidad o en parte, tales como por ejemplo el uso de una proteína no estructural híbrida que comprende secuencias de un alfavirus y de otro virus (por ejemplo, alfavirus, togavirus, virus de planta).

Por lo tanto, se contempla una variedad de modificaciones de secuencia dentro de la presente invención. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, hay una o más deleciones en secuencias que codifican gen(es) de proteína no estructural. Tales deleciones pueden estar en una proteína no estructural (nsP) 1, 2, 3 o 4, así como combinaciones de deleciones de más de un gen de nsP. Por ejemplo, y sin pretender que sea a modo de limitación, una deleción puede abarcar al menos las secuencias de nucleótidos que codifican los restos de aminoácidos 101-120, 450-470, 460-480, 470-490 o 480-500 de la nsP1 del VEE, numerados en relación con la secuencia en Kinney y col., (1989) *Virology* 170:19-30, así como regiones más pequeñas incluidas dentro de cualquiera de las anteriores.

En otra realización, una deleción puede abarcar al menos las secuencias que codifican los restos de aminoácidos 9-29, 613-633, 650-670 o 740-760 de la nsP2 del VEE, así como regiones más pequeñas incluidas dentro de cualquiera de las anteriores. En otra realización, una deleción puede abarcar al menos las secuencias que codifican los restos de aminoácidos 340-370, 350-380, 360-390, 370-400, 380-410, 390-420, 400-430, 410-440, 420-450, 430-460, 440-470, 450-480, 460-490, 470-500, 480-510, 490-520, 500-530 o 488-522 de la nsP3 del VEE, así como regiones más pequeñas incluidas dentro de cualquiera de las anteriores. En otra realización, la deleción puede abarcar al menos las secuencias que codifican los restos de aminoácidos 8-28 o 552-570 de la nsP4 del VEE, así como regiones más pequeñas incluidas dentro de cualquiera de las anteriores. Cabe destacar que aunque los intervalos de aminoácidos anteriores se ilustran usando VEE como un ejemplo, se pueden utilizar deleciones de tipo similar en otros alfavirus.

Generalmente, aunque la numeración de aminoácidos es algo diferente entre los alfavirus, principalmente debido a ligeras diferencias en las longitudes de las poliproteínas, los alineamientos en el interior o entre secuencias de diferentes alfavirus proporciona un medio para identificar regiones similares en otros alfavirus (véase el alineamiento representativo en Kinney y col. (1989) *Virology* 170:19-30). Preferentemente, las deleciones del gen de proteína no estructural están confinadas a una región o tramo de aminoácidos considerado como no conservado entre los múltiples alfavirus. Además, las regiones conservadas también se pueden someter a deleción.

2.2. Proteínas estructurales de alfavirus

Las proteínas estructurales que rodean (y en algunos casos, que interaccionan con) el replicón de alfavirus o el(los) componente(s) del vector de polinucleótido puede incluir tanto las proteínas de la cápside como de la envoltura. En algunos casos, el(los) componente(s) de los polinucleótidos están rodeados por la(s) proteína(s) de la cápside, que forman nucleocápsides. A su vez, la proteína de la nucleocápside está rodeada por una envoltura lipídica que contiene la(s) proteína(s) de la envoltura. Debe entenderse que aunque es preferente tener tanto proteínas de la cápside como de la envoltura, no se requieren ambas.

Las proteínas de la cápside del alfavirus y las proteínas de la envoltura se describen de manera general en Strauss y col. (1994) *Microbiol. Rev.*, 58:491-562. La proteína de la cápside es la proteína N-terminal de la poliproteína estructural del alfavirus y, tras el procesamiento de la poliproteína, interacciona con el ARN del alfavirus y otros monómeros de proteína de la cápside para formar estructuras de nucleocápside.

Las glucoproteínas de la envoltura de alfavirus (por ejemplo, E2, E1) sobresalen de la partícula envuelta como "púas" superficiales, que funcionalmente están implicadas en la unión del receptor y en la entrada a la célula diana.

Una o ambas de estas proteínas estructurales (o regiones de las mismas) pueden incluir una o más modificaciones en comparación con el tipo silvestre. Las proteínas estructurales "híbridas" (por ejemplo, las proteínas que contienen secuencias derivadas de dos o más alfavirus) también encuentran su uso en la práctica de la presente invención.

Las proteínas híbridas pueden incluir una o más regiones derivadas de diferentes alfavirus. Estas regiones pueden ser contiguas o no contiguas. Preferentemente, una región en particular de la proteína estructural (por ejemplo, una región funcional tal como la porción de la cola citoplasmática de la proteína de la envoltura o el dominio de unión a ARN de la proteína de la cápside) deriva de un primer alfavirus. Cualquier cantidad de las secuencias "restantes" de la proteína (por ejemplo, cualquier secuencia fuera de la región designada) puede derivar de uno o más alfavirus que son diferentes al primero. Es preferente que entre aproximadamente el 25 % al 100 % (o cualquier valor porcentual intermedio) de la porción "restante" derive de un alfavirus diferente, más preferentemente entre aproximadamente el 35 % y el 100 % (o cualquier valor porcentual intermedio), incluso más preferentemente entre aproximadamente el 50 % y el 100 % (o cualquier valor porcentual intermedio). Las secuencias derivadas de los uno o más alfavirus diferentes en el híbrido pueden ser contiguas o no contiguas, en otras palabras, las secuencias derivadas de un alfavirus pueden estar separadas mediante secuencias derivadas de uno o más alfavirus diferentes.

2.3. Replicón modificado de alfavirus de Nivel de Bioseguridad-3

Las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento también permiten la modificación de vectores de replicón o de sistemas eucariotas de iniciación de vectores en capas derivados de un alfavirus de NBS-3 (por ejemplo, VEE), de manera que se pueden utilizar a un nivel de clasificación inferior (por ejemplo, NBS-2 o NBS-1) reduciendo la secuencia de nucleótidos derivada del alfavirus parental de NBS-3 en más de un tercio pero menos de dos tercios de la longitud del genoma.

Por lo tanto, los vectores de replicón quimérico, las partículas o el ELVIS se pueden usar de manera que incluyan una secuencia de ARN de replicón de alfavirus tal como se reivindica que comprenda una secuencia 5' requerida

para la amplificación mediada por proteína no estructural, secuencias que codifican proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas, un promotor subgenómico de alfavirus, una secuencia heteróloga que no es de alfavirus, una secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural y, opcionalmente, un tramo de poliadenilato, en el que la secuencia que codifica al menos una de dichas proteínas no estructurales deriva de un virus de NBS-3 (VEE), pero en el que el ARN del replicón contiene secuencias derivadas de dicho alfavirus de Nivel de Bioseguridad 3 que en total comprende menos de dos tercios de la longitud del genoma del alfavirus parental de Nivel de Bioseguridad 3.

Por lo tanto, las secuencias de replicón tal y como se describen en el presente documento muestran no más del 66,67 % de identidad de secuencia con un alfavirus de NBS-3 (VEE) a lo largo de toda la secuencia. En otras palabras, puede haber muchas regiones individuales de identidad de secuencia en comparación con un genoma de NBS-3, pero la homología global o el porcentaje de identidad con toda la longitud del genoma de un NBS-3 no es más del 66,67 % y no menos del 33,33 %. Preferentemente, las secuencias de replicón derivadas de dicho alfavirus de Nivel de Bioseguridad 3 comprenden entre el 40 % y dos tercios de la longitud del genoma del alfavirus parental de Nivel de Bioseguridad 3. Más preferentemente, las secuencias de replicón derivadas de dicho alfavirus de Nivel de Bioseguridad 3 comprenden entre el 50% y dos tercios de la longitud del genoma del alfavirus parental de Nivel de Bioseguridad 3. Incluso más preferentemente, las secuencias de replicón derivadas de dicho alfavirus de Nivel de Bioseguridad 3 comprenden entre el 55% y dos tercios de la longitud del genoma del alfavirus parental de Nivel de Bioseguridad 3. Lo más preferentemente, las secuencias de replicón derivadas de dicho alfavirus de Nivel de Bioseguridad 3 comprenden entre el 60% y dos tercios de la longitud del genoma del alfavirus parental de Nivel de Bioseguridad 3.

Tal como se usa en el presente documento, las definiciones de Nivel de Bioseguridad (por ejemplo, Nivel de Bioseguridad 2, 3, 4) se considera que son las de la publicación del HHS "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", del U.S. Department of Health and Human Services (Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health), cuyos extractos que pertenecen a tales clasificaciones se incluyen a continuación.

Las prácticas, el equipamiento de seguridad y el diseño y la construcción de las instalaciones del Nivel de Bioseguridad 1 son apropiados para laboratorios de enseñanza y preparación de educación universitaria y secundaria y otros laboratorios en los que el trabajo se hace con cepas definidas y caracterizadas de microorganismos que se sabe que no causan sistemáticamente enfermedades en seres humanos adultos. *Bacillus subtilis*, *Naegleria grubri*, el virus de la hepatitis canina infecciosa y organismos exentos según las directrices del ADN recombinante del NIH son representativos de microorganismos que cumplen estos criterios. Muchos agentes que no se asocian habitualmente con procesos de enfermedad en seres humanos son, sin embargo, patógenos oportunistas y pueden causar infección en individuos jóvenes, en ancianos y en personas inmunodeficientes o inmunoinhibidas. Las cepas de vacuna que se han sometido a pases múltiples *in vivo* no deberían considerarse avirulentas simplemente porque sean cepas de vacuna. El Nivel de Bioseguridad 1 representa un nivel básico de contención que se basa en las prácticas microbiológicas sin barreras primarias o secundarias recomendadas, que no sean un fregadero para lavarse las manos.

Las prácticas, el equipamiento de seguridad y el diseño y la construcción de las instalaciones del Nivel de Bioseguridad 2 se aplican a laboratorios clínicos, de diagnóstico, de enseñanza y otros laboratorios en los que se trabaja con un amplio espectro de agentes autóctonos de riesgo moderado que están presentes en la comunidad y se asocian con enfermedades humanas de gravedad variable. Con buenas técnicas microbiológicas, estos agentes se pueden usar de manera segura en actividades llevadas a cabo en una superficie de trabajo abierta, asegurando que el potencial de producción de salpicaduras o aerosoles sea bajo. El virus de la hepatitis B, el VIH, la salmonela y el *Toxoplasma* spp. son ejemplos representativos de microorganismos asignados a este nivel de contención. El Nivel de Bioseguridad 2 es apropiado cuando se trabaja con cualquier tipo de sangre derivada de seres humanos, fluidos corporales, tejidos o líneas celulares primarias humanas en las que la presencia de un agente infeccioso puede ser desconocida. (el personal de laboratorio que trabaja con materiales de procedencia humana debería consultar el *Bloodborne Pathogen Standard 2* de la OSHA, para precauciones específicas requeridas). Los principales peligros para el personal que trabaja con estos agentes se relacionan con exposiciones accidentales percutáneas o de la membrana mucosa, o con la ingestión de materiales infecciosos. Debe tomarse una extrema precaución con las agujas o los instrumentos afilados contaminados. Incluso aunque se sepa que los organismos manipulados de manera rutinaria en un Nivel de Bioseguridad 2 no se transmiten por aerosol, los procedimientos con aerosol o con una alta posibilidad de producir salpicaduras que puedan aumentar el riesgo de tal exposición del personal se deben llevar a cabo con un equipamiento de contención primaria o en dispositivos tales como un BSC o copas de centrifugación de seguridad. Otras barreras primarias deberían usarse según sea apropiado, tales como escudos contra salpicaduras, protección facial, batas y guantes. Las barreras secundarias, tales como los fregaderos para el lavado de manos, y las instalaciones de descontaminación de residuos, pueden estar disponibles para reducir la posible contaminación ambiental.

Las prácticas, el equipamiento de seguridad y el diseño y la construcción de las instalaciones del Nivel de Bioseguridad 3 se aplican a instalaciones clínicas, de diagnóstico, de enseñanza, de investigación o de producción en las que se realiza el trabajo con agentes autóctonos o exóticos con una posibilidad de transmisión mediante la respiración, y que pueden causar infección grave y posiblemente letal. *Mycobacterium tuberculosis*, el virus de la

encefalitis de St. Louis y *Coxiella burnetii* son ejemplos representativos de los microorganismos asignados a este nivel. Los principales peligros para el personal que trabaja con estos agentes se relacionan con la autoinoculación, la ingestión y la exposición a aerosoles infecciosos. A un Nivel de Bioseguridad 3, se pone más énfasis en poner barreras primarias y secundarias para proteger al personal en áreas contiguas, en la comunidad y el ambiente de la exposición a posibles aerosoles infecciosos. Por ejemplo, todas las manipulaciones del laboratorio se deben realizar en un BSC u otro equipamiento cerrado, tal como una cámara de generación de aerosoles hermética a gases. Las barreras secundarias para este nivel incluyen el acceso controlado al laboratorio y los requerimientos de ventilación que minimicen la liberación de aerosoles infecciosos desde el laboratorio.

El alfavirus de NBS-3 que se usa en la práctica de la presente invención es el virus de la encefalitis equina venezolana (excluyendo la cepa de la vacuna TC-83).

Las prácticas, el equipamiento de seguridad y el diseño y la construcción de las instalaciones del Nivel de Bioseguridad 4 se aplican al trabajo con agentes peligrosos y exóticos que suponen un alto riesgo individual de enfermedad letal, que se puede transmitir por aerosol y para el cual no hay vacunas disponibles o terapia. Los agentes con una relación antigénica próxima o idéntica a los agentes de Nivel de Bioseguridad 4 también deben manejarse a este nivel. Cuando se han obtenido suficientes datos, el trabajo con estos agentes puede continuar a este nivel o a un nivel más bajo. Los virus, tales como el virus Marburg o el virus de la fiebre hemorrágica de congo-crimea, se manipulan en un Nivel de Bioseguridad 4. Los principales peligros para el personal que trabaja con agentes de Nivel de Bioseguridad 4 son la exposición respiratoria a aerosoles infecciosos, exposición de la membrana mucosa o de lesiones cutáneas a gotas infecciosas, y la autoinoculación. Todas las manipulaciones de materiales de diagnóstico posiblemente infecciosos, los aislados, y los animales infectados de manera natural o experimental, suponen un alto riesgo de exposición e infección para el personal del laboratorio, la comunidad y el ambiente. En un laboratorio, el aislamiento completo del trabajador frente a los materiales infecciosos en aerosol, se realiza principalmente trabajando en un BSC de clase III o en un traje personal de cuerpo entero, con presión positiva y suministro de aire. La propia instalación de Nivel de Bioseguridad 4 es generalmente un edificio separado o una zona completamente aislada con requerimientos complejos de ventilación especializada y sistemas de gestión de residuos para impedir la liberación de agentes viables al ambiente.

Tal como se utiliza dentro del ámbito de la presente invención, la creación de un replicón que contiene más de un tercio pero menos de dos tercios de la longitud de la secuencia del genoma original de cualquier virus de NBS-3 (denominado el virus parental) puede realizarse en una variedad de formas. Por ejemplo, las regiones contiguas o no contiguas del virus parental se pueden eliminar. Como alternativa, las regiones contiguas o no contiguas del virus parental se pueden utilizar. Como alternativa, las regiones del virus parental se pueden escindir y ligar en una estructura principal de NBS-2 o NBS-1.

En determinadas realizaciones, los extremos 5' y/o 3' del alfavirus (secuencias requeridas para la amplificación mediada por proteína no estructural) se reducen a la mínima secuencia de nucleótidos requerida para mantener la función suficiente en el contexto de un replicón para la expresión de secuencias heterólogas o como alternativa, se pueden reemplazar con una secuencia que no es de alfavirus capaz de realizar la misma función. En otras realizaciones, uno o más genes de proteína no estructural de alfavirus se pueden eliminar dentro de regiones específicas que no se conservan bien entre los alfavirus (por ejemplo, región no conservada de la nsP3) o de otro lugar. Como alternativa, la región del promotor subgenómico del alfavirus o la región NTR 5' subgenómica puede contener deleciones. En otras realizaciones adicionales más, uno o más genes de proteína estructural pueden eliminarse, así como combinaciones de cualquiera de los anteriores.

3.0. Procedimientos de producción de partículas de replicón químérico

Las partículas de replicón de alfavirus químérico de acuerdo con la presente invención se pueden producir usando una variedad de procedimientos publicados. Tales procedimientos incluyen, por ejemplo, enfoques de empaquetamiento transitorio, tales como la cotransfección *in vitro* de replicón transcrito y ARN auxiliar defectuoso (Liljestrom, Bio/Technology 9:1356-1361, 1991; Bredenbeek y col., J. Virol. 67:6439-6446, 1993; Frolov y col., J. Virol. 71:2819-2829, 1997; Pushko y col., Virology 239:389-401, 1997; las Patentes de Estados Unidos 5.789.245 y 5.842.723) o construcciones de replicones y auxiliares defectuosos basados en ADN del plásmido (Dubensky y col., J. Virol. 70:508-519, 1996), así como la introducción de replicones de alfavirus dentro de líneas celulares de empaquetamiento (PCL, del inglés, *packaging cell lines*) estables (Polo y col., PNAS 96:4598-4603, 1999; las Patentes de Estados Unidos 5.789.245, 5.842.723, 6.015.694; los documentos WO 97/38087, WO 99/18226, WO 00/61772 y WO 00/39318).

En realizaciones preferidas, las líneas celulares de empaquetamiento de alfavirus estable se utiliza para la producción de partículas de replicón. Las PCL se puede transfectar con ARN de replicón transcrito *in vitro*, se puede transfectar con replicón basado en ADN del plásmido (por ejemplo, vector de ELVIS), o infectar con una reserva de inóculos de partículas de replicón, y después incubar en condiciones y durante un tiempo suficiente para producir partículas de replicón empaquetadas de alto título en el sobrenadante del cultivo. En realizaciones particularmente preferidas, las PCL se utilizan en un procedimiento de dos etapas, en el que como primera etapa, una reserva de inóculos de partículas de replicón se produce transfectando la PCL con un replicón basado en ADN del plásmido. Se produce después una mayor reserva de partículas de replicón en la segunda etapa, infectando un cultivo reciente de

las PCL con la reserva de inóculo. Esta infección se puede realizar usando diversas multiplicidades de infección (MDI), incluyendo una MDI = 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 3, 5 o 10. Preferentemente la infección se realiza a una MDI baja (por ejemplo, menor de 1). Las partículas de replicón a títulos incluso $>10^8$ unidades infecciosas (UI)/ml se pueden recoger de las PCL infectadas con la reserva de inóculo. Además, las partículas de replicón se pueden pasar posteriormente a cultivos mayores de PCL sin tratar mediante una infección de multiplicidad baja repetida, dando como resultado preparaciones a escala comercial con el mismo título elevado. Cabe destacar que, usando las PCL de la configuración del gen estructural de la "división", esta reserva de partículas de replicón se puede producir libre de RCV contaminante detectable.

Tal como se describe anteriormente, la producción a gran escala de partículas de replicón de alfavirus se puede realizar usando un biorreactor. Preferentemente, el biorreactor es un biorreactor de componente externo, que es un sistema de biorreactor modular integrado para el cultivo en masa, el crecimiento y el control de los procesos de las células unidas al sustrato. La unión y propagación de células (por ejemplo, células de empaquetamiento de alfavirus) tiene lugar en un recipiente o una cámara con superficies tratadas de cultivo tisular, y las células están con medio reciente para aumentar la productividad celular. El control y los ajustes se realizan para parámetros tales como gases, temperatura, pH, glucosa, etc., y el vector bruto se recoge usando una bomba de perfusión. Típicamente, los componentes individuales de un biorreactor externo separan los módulos externos que están conectados (es decir, mediante tubos). Los componentes externos pueden ser bombas, depósitos, oxigenadores, módulos de cultivo y otras partes no convencionales. Un ejemplo representativo de un biorreactor de componente externo es el sistema CellCube™ (Coming, Inc).

Además de usar el biorreactor de componente externo descrito en el presente documento, también se puede usar un biorreactor de tanque de agitación más tradicional, en muchos casos, para la producción de partículas de replicón de alfavirus. En un biorreactor de tanque de agitación, las células de empaquetamiento de alfavirus pueden no estar unidas a cualquier matriz (es decir, flotando en suspensión) o unidas a una matriz (por ejemplo, polidiscos, micro- o macrovehículos, perlas). Como alternativa, se puede usar un sistema de cultivo de fibra hueca.

Después de la recolección, los sobrenadantes del cultivo en bruto que contienen las partículas de replicón de alfavirus quimérico se pueden aclarar pasando lo recogido a través de un filtro (por ejemplo, de un tamaño de poro de 0,2 μ M, 0,45 μ M, 0,65 μ M, 0,8 μ M). Opcionalmente, los sobrenadantes crudos se pueden someter a una centrifugación de baja velocidad antes de la filtración para eliminar los residuos celulares de gran tamaño. En una realización, se añade una endonucleasa (por ejemplo, bencenasa, Sigma #E8263) a la preparación de partículas de replicón de alfavirus antes o después de la etapa de purificación cromatográfica para digerir el ácido nucleico exógeno. Además, se puede concentrar la preparación antes de la purificación usando uno de cualquiera de los procedimientos ampliamente conocidos (por ejemplo, filtración de flujo tangencial).

Las partículas de replicón de alfavirus crudas o aclaradas se pueden concentrar y purificar mediante técnicas cromatográficas (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad). Se pueden realizar dos o más de tales procedimientos de purificación de manera secuencial. En realizaciones preferidas, se realiza al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico y utiliza una resina de intercambio iónico, tal como una resina de intercambio iónico con tentáculos, y se realiza al menos una etapa de cromatografía de exclusión por tamaños. Brevemente, los filtrados de partículas de replicón de alfavirus aclarados se pueden cargar en una columna que contiene una matriz o una resina de intercambio iónico cargada (por ejemplo, intercambio de aniones o de cationes). La matriz o resina puede consistir en una variedad de sustancias, incluyendo pero sin limitación, agarosa reticulada, poliestireno reticulado, estireno reticulado, resina de poliéter hidrofílica, resina acrílica y resina basada en metacrilato. El componente de intercambiador iónico puede comprender, pero sin limitación, un intercambiador catiónico seleccionado de la lista que consiste en intercambiador de catión sulfopropilo, un intercambiador de catión carboximetilo, intercambiador de ácido sulfónico, un intercambiador de catión metilsulfonato y un intercambiador de SO_3^- . En otras realizaciones, el componente intercambiador de iones puede comprender, pero sin limitación, un intercambiador aniónico seleccionado de la lista que consiste en DEAE, TMAE y DMAE. Lo más preferentemente, la cromatografía de intercambio iónico se realiza usando un intercambiador catiónico con tentáculos, en el que la resina de intercambio iónico es una resina basada en metacrilato con un intercambiador de catión SO_3^- (por ejemplo, EDM SO_3^- de Fractogel®).

Las partículas de replicón quimérico se pueden unir a la resina de intercambio iónico, seguido de uno o más lavados con tampón que contiene una sal (por ejemplo, NaCl 250 mM o menos). Después, las partículas de replicón se pueden eluir de la columna en forma purificada usando un tampón con una elevada concentración de sal.

En realizaciones preferidas, la concentración de sal es de al menos 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM o 500 mM. La elución se puede controlar preferentemente mediante un espectrofotómetro a 280 nm, pero también mediante ensayo de título de replicón, ensayo de transferencia de la expresión (TOE, del inglés *transfer of expression*) o análisis de gel proteico con la posterior tinción con Coomassie o mediante transferencia de Western.

Posteriormente, se puede intercambiar el tampón de elución de mayor salinidad por un tampón más deseable, por ejemplo, mediante la dilución en una solución acuosa adecuada o pasando el eluato que contiene partículas a través de una columna de exclusión molecular. Además, el uso de una columna de exclusión por tamaño molecular

también proporciona, en muchos casos, una purificación adicional. Por ejemplo, en una realización, se puede usar la cromatografía de Sephacryl S-500 o S-400 (Farmacia) tanto como un intercambio de tampón así como para purificar adicionalmente las fracciones que contienen las partículas de replicón eluidas de una columna de intercambio iónico. Usando esta resina particular, las partículas de replicón generalmente se eluyen en el volumen de vacío tardío y muestran mejora en el nivel de pureza, ya que algunos de los contaminantes son de menor peso molecular y se retienen en la columna durante más tiempo. Sin embargo, también se podrían usar resinas alternativas de diferentes composiciones así como de exclusión por tamaño que podrían producir resultados similares o mejores. En estas estrategias, las resinas de mayor tamaño tales como Sephacryl S-1000 se pueden incorporar de manera que permitan la entrada de las partículas de replicón en la matriz y, por tanto, se retengan durante más tiempo, permitiendo el fraccionamiento.

Los procedimientos descritos en el presente documento son procedimientos distintos ampliamente utilizados en los que los ARN auxiliares defectuosos y el vector replicón contiene genes derivados del mismo virus, permitiendo de este modo que el proceso de ensamblaje de partículas de replicón se dé de forma natural y dé como resultado una partícula de replicón que tiene un empaquetado de replicón dentro de una cápside vírica y proteína(s) de la envoltura derivada(s) del mismo virus que aporta los genes de proteína no estructural. En consecuencia, en tales procedimientos, la señal de empaquetamiento (también conocida como secuencias de empaquetamiento), el dominio de unión a ARN, el dominio de interacción con glucoproteína y las glucoproteínas de la envoltura son todos del mismo virus.

Por el contrario, los procedimientos descritos en el presente documento implican la producción satisfactoria y eficaz de partículas de replicón de alfavirus a partir de secuencias derivadas de dos o más alfavirus. Tal como se describe en el presente documento, las partículas se producen de una manera más eficaz y, además, tienen también otras ventajas.

También se proporcionan procedimientos, tal como se reivindica, para el empaquetamiento de ARN replicón de alfavirus dentro de partículas de replicón (producir partículas de replicón) y para reducir la probabilidad de generar virus competentes en la replicación (por ejemplo, virus de tipo silvestre) durante el empaquetamiento, que comprenden introducir en una célula admisible un ARN replicón de alfavirus que codifica proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas y un polipéptido heterólogo, junto con uno o más ARN auxiliar(es) defectuoso(s) que codifican al menos una proteína estructural de alfavirus, e incubar dicha célula en condiciones adecuadas durante un tiempo suficiente para permitir la producción de partículas de replicón. En algunas realizaciones, tanto el ARN replicón como el ARN auxiliar defectuoso incluyen elementos de control, particularmente una secuencia 5' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural, un medio para expresar las secuencias codificantes de polipéptidos (las secuencias codificantes de polipéptidos también se denominan el gen próximo a 3'), por ejemplo un promotor que conduce la expresión de (1) la proteína heteróloga en el replicón y (2) las proteínas estructurales en el ARN auxiliar defectuoso, una secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural, un tramo de poliadenilato y, opcionalmente, una NTR 5' subgenómica. Además, a diferencia de los procedimientos conocidos, uno o más de estos elementos de control son diferentes (por ejemplo, la secuencia es diferente) entre el ARN en el replicón y el ARN en el auxiliar defectuoso. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la secuencia 5' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural es diferente entre el replicón y el ARN auxiliar. En otras realizaciones, el medio para expresar las secuencias codificantes de polipéptidos y/o la secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural es diferente entre el replicón y el ARN auxiliar.

Un experto en la materia entenderá fácilmente que la introducción de ARN replicón dentro de células admisibles se puede realizar mediante diversos medios, tales como, por ejemplo, transfección o electroporación de ARN (por ejemplo, ARN transcrito *in vitro*), transcripción de ARN dentro de la célula a partir de ADN (por ejemplo, sistema eucariota de iniciación de vectores en capas) o administración mediante partículas víricas o de tipo virus (por ejemplo, partículas de replicón) y la introducción de ARN auxiliar defectuoso dentro de células admisibles también se puede realizar mediante diversos medios, tales como, por ejemplo, transfección o electroporación de ARN (por ejemplo, ARN transcrito *in vitro*) o transcripción de ARN dentro de la célula a partir de ADN (por ejemplo, casete de expresión de proteína estructural).

Además, las modificaciones para reducir secuencias homólogas también se pueden hacer a nivel de la estructura principal de ADN, tales como, por ejemplo, en un sistema eucariota de iniciación de vector en capas o casete de expresión de proteína estructural usado para la derivación de células de empaquetamiento. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, promotores eucariotas alternativos, secuencias de poliadenilación, marcadores de resistencia a antibióticos, orígenes de replicación bacterianos y otras secuencias de estructura principal no funcional.

4.0 Composiciones farmacéuticas

En el presente documento también se desvelan composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las partículas de replicón de alfavirus, vectores y/o replicones descritos en el presente documento en combinación con un vehículo, un diluyente o un receptor, farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones preferidas, a las partículas de replicón purificadas se añade una cantidad suficiente de tampón de formulación para formar una suspensión acuosa. En realizaciones preferidas, el tampón de formulación comprende un sacárido y un componente

de tamponamiento en agua, y también puede contener uno o más aminoácidos o un aditivo estructural de alto peso molecular. El tampón de formulación se añade en cantidad suficiente para alcanzar una concentración final deseada de los constituyentes y para diluir mínimamente las partículas de replicón. La suspensión acuosa se puede conservar después, preferentemente a -70 °C o secar de manera inmediata.

5 La suspensión acuosa se puede secar mediante liofilización o evaporación a temperatura ambiente. Brevemente, la liofilización implica las etapas de enfriar la suspensión acuosa por debajo de la temperatura de transición al estado gaseoso o por debajo de la temperatura del punto eutéctico de la suspensión acuosa y retirar el agua de la suspensión enfriada mediante sublimación para formar una partícula de replicón liofilizada. En una realización, las alícuotas del virus recombinante formulado se colocan en una cámara refrigerada de Edwards (unidad RC3S de la estantería 3) conectada a un liofilizador (Supermodulyo 12K). Para liofilizar las partículas de replicón formuladas, se utiliza un procedimiento multietapa de secado en frío, tal como se describe en Phillips y col. (Cryobiology 18:414, 1981), preferentemente a una temperatura de -40 °C a -45 °C. La composición resultante contiene menos del 10 % de agua por peso de las partículas de replicón liofilizadas. Una vez liofilizadas, las partículas de replicón son estables y se pueden conservar de -20 °C a 25 °C, tal como se trata con más detalle a continuación. En el procedimiento con evaporación, el agua se retira de la suspensión acuosa a temperatura ambiente mediante evaporación. En una realización, el agua se retira mediante un procedimiento de secado por pulverización, en el que la suspensión acuosa se administra en un flujo de gas precalentado, que normalmente da como resultado una evaporación de manera rápida del agua de las gotas de la suspensión. Una vez deshidratado, el virus recombinante es estable y se puede conservar de -20 °C a 25 °C.

20 Las soluciones acuosas usadas para la formulación preferentemente comprenden un sacárido, un componente de tamponamiento y agua. La solución también puede incluir uno o más aminoácidos y un aditivo estructural de alto peso molecular. Esta combinación de componentes actúa para preservar la actividad de las partículas de replicón tras la congelación y también la liofilización o el secado a través de la evaporación. Aunque un sacárido preferido es lactosa, se pueden usar otros sacáridos, tales como sacarosa, manitol, glucosa, trehalosa, inositol, fructosa, maltosa o galactosa. Una concentración particularmente preferida de lactosa es 3 % - 4 % en peso.

El aditivo estructural de alto peso molecular ayuda en la prevención de la agregación de partículas durante la congelación y proporciona un soporte estructural en el estado liofilizado o seco. Se considera que los aditivos estructurales son de "alto peso molecular" si tienen un P.M. mayor de 5000. Un aditivo estructural de alto peso molecular preferido es la albúmina de suero humano. Sin embargo, también se pueden usar otras sustancias, tales como hidroxietilcelulosa, hidroximetilcelulosa, dextrano, celulosa, gelatina o povidona. Una concentración particularmente preferida de albúmina de suero humano es del 0,1 % en peso.

El componente de tamponamiento actúa para tamponar la solución manteniendo un pH relativamente constante. Se pueden usar diversos tampones, dependiendo del intervalo de pH deseado, preferentemente entre 7,0 y 7,8. Los tampones adecuados incluyen tampón fosfato y tampón citrato. Además, es preferible que la solución acuosa contenga una sal neutra que se usa para ajustar las partículas de replicón formuladas finales a una concentración de sal isoosmótica apropiada. Las sales neutras adecuadas incluyen cloruro de sodio, cloruro de potasio o cloruro de magnesio. Una sal preferida es cloruro de sodio. Las partículas de replicón liofilizadas o deshidratadas se pueden reconstituir usando diversas sustancias, pero se reconstituyen preferentemente usando agua. En algunos casos, también se pueden usar soluciones de sal diluida que lleven la formulación final a la isotonicidad.

40 5.0 Aplicaciones

Las partículas de alfavirus quimérico se pueden usar para administrar una amplia variedad de secuencias de nucleótidos que incluyen, por ejemplo, secuencias que codifican linfocinas o citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-12, GM-CSF), enzimas convertidoras de profármacos (por ejemplo, HSV-TK, VZV-TK), antígenos que estimulan una respuesta inmunitaria (por ejemplo, VIH, VHC, antígenos tumorales), moléculas terapéuticas, tales como factores de crecimiento o reguladores (por ejemplo, VEGF, FGF, PDGF, BMP), proteínas que ayudan o inhiben una respuesta inmunitaria, así como ribozimas y secuencias antisentido. Las secuencias de nucleótidos anteriores incluyen aquellas citadas previamente (por ejemplo, en los documentos US 6.015.686, WO 9738087 y WO 9918226), y pueden obtenerse a partir de depósitos, se pueden clonar fácilmente a partir de ARN celular u otro ARN usando secuencias publicadas, o se pueden sintetizar, por ejemplo, en un sintetizador de ADN de Applied Biosystems Inc. (por ejemplo, sintetizador de ADN de APB modelo 392 (Foster City, CA)).

Para los fines de la presente invención, se puede usar prácticamente cualquier polipéptido o polinucleótido. Los antígenos pueden derivar de cualquiera de los diversos virus, bacterias, parásitos y hongos conocidos así como de cualquiera de los diversos antígenos tumorales o de cualquier otro antígeno para el que se desea una respuesta inmunitaria. Además, para los fines de la presente invención, un "antígeno" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservativas en la naturaleza), en la secuencia natural, siempre que la proteína conserve la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria. Estas modificaciones pueden ser intencionadas, como a través de mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de hospedadores que producen los antígenos.

Los antígenos se pueden usar solos o en cualquier combinación. (Véase, *por ejemplo*, el documento WO 02/00249

que describe el uso de combinaciones de antígenos bacterianos). Las combinaciones pueden incluir múltiples antígenos del mismo patógeno, múltiples antígenos de diferentes patógenos o múltiples antígenos del mismo y de diferentes patógenos. Por lo tanto, los antígenos bacterianos, víricos, tumorales y/u otros antígenos se pueden incluir en la misma composición o se pueden administrar al mismo sujeto por separado. En general, para aumentar una respuesta inmunitaria, se prefiere el uso de combinaciones de antígenos.

Como ejemplos no limitantes de patógenos bacterianos se incluyen, difteria (véase, por ejemplo, el capítulo 3 de Vaccines, 1998, Eds. Plotkin y Mortimer (ISBN 0-7216-1946-0), estafilococos (por ejemplo, *Staphylococcus aureus* tal como se describe en Kuroda y col. (2001) Lancet 357:1225-1240), cólera, tuberculosis, *C. tetani*, también conocido como tétanos (véase, por ejemplo, el capítulo 4 de Vaccines, 1998, Eds. Plotkin & Mortimer (ISBN 0-7216-1946-0), estreptococos de los grupos A y B (incluyendo *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pyogenes* tal como se describe, por ejemplo, en Watson y col. (2000) Pediatr. Infect. Dis. J. 19:331-332; Rubin y col. (2000) Pediatr Clin. North Am. 47:269-284; Jedrzejewski y col. (2001) Microbiol Mol Biol Rev 65:187-207; Schuchat (1999) Lancet 353:51-56; en las solicitudes de patente británicas 0026333.5; 0028727.6; 015640.7; Dale y col. (1999) Infect Dis Clin North Am 13:227-1243; Ferretti y col. (2001) PNAS USA 98:4658-4663), *pertussis* (véase, por ejemplo, Gustafsson y col. (1996) N. Engl. J. Med. 334:349-355; Rappuoli y col. (1991) TIBTECH 9:232-238), meningitis, *Moraxella catarrhalis* (véase, por ejemplo, McMichael (2000) Vaccine 19 Suppl. 1:S101-107) y otros estados patogénicos, incluyendo, sin limitación, *Neisseria meningitidis* (A, B, C, Y), *Neisseria gonorrhoeae* (véase, por ejemplo, los documentos WO 99/24578; 1 WO 99/36544 y WO 99/57280), *Helicobacter pylori* (por ejemplo, CagA, VacA, NAP, HopX, HopY y/o ureasa, como se describe, por ejemplo, en los documentos WO 93/18150, WO 99/53310 y WO 98/04702), y *Haemophilus influenzae*. *Haemophilus influenzae* de tipo B (HIB) (véase, por ejemplo, Costantino y col. (1999) Vaccine 17:1251-1263), *Porphyromonas gingivalis* (Ross y col. (2001) Vaccine 19:4135-4132) y combinaciones de los mismos.

Como ejemplos no limitantes de patógenos víricos se incluyen meningitis, rinovirus, gripe (Kawaoka y col., Virology (1990) 179:759-767; Webster y col., "Antigenic variation among type A influenza viruses," p. 127-168. En: P. Palese y D.W. Kingsbury (ed.), Genetics of influenza viruses. Springer-Verlag, Nueva York), virus sincicial respiratorio (RSV), virus paragripal (PIV) y similares. Los antígenos derivados de otros virus también encontrarán su uso en la presente invención, tal como, sin limitación, proteínas de miembros de las familias *Picornaviridae* (por ejemplo, poliovirus, etc. como se describe, por ejemplo, en Sutter y col. (2000) Pediatr Clin North Am 47:287-308; Zimmerman y Spann (1999) Am Fam Physician 59:113-118; 125-126); *Caliciviridae*; *Togaviridae* (por ejemplo, virus de la rubeola, virus del dengue, etc.); la familia *Flaviviridae*, incluyendo los géneros *Flavivirus* (por ejemplo, virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, serotipos del virus Dengue, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus del Nilo Occidental); *Pestivirus* (por ejemplo, virus de la fiebre porcina clásica, virus de la diarrea viral bovina, virus de la enfermedad de la frontera); y *Hepacivirus* (por ejemplo, hepatitis A, B y C, como se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos n.º 4.702.909; 5.011.915; 5.698.390; 6.027.729; y 6.297.048); *Parvovirus* (por ejemplo, parvovirus B19); *Coronaviridae*; *Reoviridae*; *Bimaviridae*; *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de la rabia, etc. como se describe, por ejemplo, en Dressen y col. (1997) Vaccine 15 Suppl:s2-6; MMWR Morb Mortal Wkly Rep. Enero de 1998 16:47(1):12, 19); *Filoviridae*; *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus de las paperas, virus del sarampión, rubeola, virus sincicial respiratorio, etc. como se describe en los capítulos 9 a 11 de Vaccines, 1998, Eds. Plotkin y Mortimer (ISBN 0-7216-1946-0); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo, virus de la gripe tipos A, B y C, etc. como se describe en el capítulo 19 de Vaccines, 1998, Eds. Plotkin y Mortimer (ISBN 0-7216-1946-0),.); *Bunyaviridae*; *Arenaviridae*; *Retroviridae* (por ejemplo, HTLV-1; HTLV-11; HIV-1 (también conocido como HTLV-III, LAV, ARV, HTI,R, etc.)), incluyendo pero sin limitarse a antígenos de los aislados HIVIIIb, HIVSF2, HIVLAV, HIVI-AL, I-IIVMN); HIV-I CM235, HIV-I IJS4; HIV-2; virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS) entre otros. Además, los antígenos también pueden derivar del virus del papiloma humano (VPH) y de los virus de la encefalitis transmitida por garrapatas. Véase, por ejemplo, Virology, 3ª Edición (W.K. Joklik ed. 1988); Fundamental Virology, 2ª Edición (B.N. Fields y D.M. Knipe, eds, 1991), para una descripción de estos y otros virus.

Los antígenos de la familia de virus de la hepatitis, incluyendo el virus de la hepatitis A (VHA) (véase, por ejemplo, Bell y col. (2000) Pediatr Infect Dis. J. 19:1187-1188; Iwarson (1995) APMIS 103:321-326), virus de la hepatitis B (VHB) (véase, por ejemplo, Gerlich y col. (1990) Vaccine 8 Suppl:S63-68 y 79-80), virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la hepatitis delta (VHD), virus de la hepatitis E (VHE) y virus de la hepatitis G (VHG), también se pueden usar de manera conveniente en las técnicas descritas en el presente documento. A modo de ejemplo, la secuencia genómica del virus VHC es conocida, como lo son los procedimientos para obtener la secuencia. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones Internacionales N.º WO 89/04669, WO 90/11089 y WO 90/14436. También se incluyen en la invención variantes moleculares de tales polipéptidos, por ejemplo, como se describe en los documentos PCT/US99/31245, PCT/US99/31273 y PCT/US99/31272.

Como ejemplos no limitantes de antígenos tumorales se incluyen antígenos reconocidos mediante linfocitos T CD8+ (por ejemplo, antígenos de diferenciación de melanocitos de melanoma tales como MART-1, gp100, tirosinasa, proteína 1 relacionada con tirosinasa, proteína 2 relacionada con tirosinasa, receptor de hormona estimuladora de melanocitos; antígenos mutados, tales como beta-catenina, MUM-1, CDK-4, caspasa-8, KIA 0205, HLA-A2-R1701; antígenos de cáncer de testículos tales como MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-12, BAGE, GAGE y NY-ESO-1; y antígenos compartidos no mutados sobreexpresados en cáncer tales como alfa-fetoproteína, proteína catalítica de la telomerasa, G-250, MUC-1, antígeno carcinoembrionario, p53, Her-2-neu) así como antígenos reconocidos por los linfocitos T CD4+ (por ejemplo, gp100, MAGE-1, MAGE-3, tirosinasa, NY-ESO-1, trifosfato isomerasa, CDC-27 y

LDLR-FUT). Véase, también, el documento WO 91/02062, la Patente de EE.UU. n.º 6.015.567, los documentos WO 01/08636, WO 96/30514, la Patente de EE.UU. n.º 5.846.538 y la Patente de Estados Unidos n.º 5.869.445.

En determinadas realizaciones, se puede usar uno o más antígenos tumorales. Los antígenos tumorales derivan de componentes celulares mutados o alterados. Tras la alteración, los componentes celulares ya no realizan sus funciones reguladoras y, por lo tanto, la célula puede experimentar un crecimiento descontrolado. Los ejemplos representativos de componentes celulares alterados incluyen ras, p53, Rb, proteína alterada codificada por el gen del tumor de Wilms, ubiquitina, mucina, proteína codificada por los genes DCC, APC y MCC, así como receptores o estructuras de tipo receptor tales como neu, el receptor de la hormona tiroidea, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el receptor de la insulina, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el receptor del factor estimulador de colonias (CSF). Estos, así como otros componentes celulares, se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos n.º 5.693.522 y en las referencias citadas en ese documento.

Estas secuencias heterólogas seleccionadas se pueden administrar a un mamífero de sangre caliente (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano u otro animal de sangre caliente, tal como un caballo, una vaca, un cerdo, una oveja, un perro, un gato, una rata o un ratón) para su uso como una vacuna o compuesto terapéutico, que comprende la etapa de administrar al mamífero partículas de replicón o sistemas eucariotas de iniciación de vectores en capas tal como se describe en el presente documento, que son capaces de expresar la secuencia heteróloga seleccionada. La administración puede realizarse mediante diversas vías (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, oral, intraocular, intranasal, rectal, intratumoral). Además, las partículas de replicón pueden administrarse tanto de manera directa (es decir, *in vivo*) o a células que se han extraído (*ex vivo*) y posteriormente devuelto al mamífero de sangre caliente.

Cabe destacar que el procedimiento seleccionado para la producción de partículas de replicón de alfavirus quimérico de la presente invención debería usar técnicas conocidas en la materia para minimizar la posibilidad de generar virus competentes en la replicación (VCR) contaminantes. Una de tales estrategias es el uso de auxiliares defectuosos o PCL que contienen una "división" de casetes de expresión de proteína estructural (véanse las Patentes de Estados Unidos 5.789.245; 6.242.259; 6.329.201). En este contexto, los genes de proteína estructural de alfavirus se segregan en construcciones de expresión distintas (por ejemplo, cápside distinta de glucoproteínas) de tal manera que la recombinación para regenerar un complemento completo de proteínas estructurales es muy improbable. En el presente documento se desvelan composiciones y procedimientos para reducir la probabilidad de eventos de recombinación durante la producción de partículas de replicón de alfavirus, además de los procedimientos convencionales conocidos en la materia. Por ejemplo, cualquiera de los diversos elementos funcionales (por ejemplo, elementos de control) habitualmente compartidos por el replicón y el ARN auxiliar defectuoso, o compartidos entre los múltiples ARN auxiliares defectuosos (también sistemas eucariotas de iniciación de vectores en capas y casetes de expresión de proteína estructural) se pueden sustituir con elementos alternativos que realizan la misma función. En este caso, la homología entre moléculas de ARN disminuye o desaparece. Como alternativa, la probabilidad de que el molde de polimerasa se intercambie entre las moléculas de ARN también se puede reducir. Elementos funcionales representativos, compartidos habitualmente por el replicón y el ARN auxiliar defectuoso o compartidos entre múltiples ARN auxiliares defectuosos, así como algunas alternativas para cada uno tal como se contemplan en la presente invención incluyen, pero no se limitan a aquellas descritas anteriormente en la Sección B anterior.

Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar de una manera más completa la presente invención. Además, estos ejemplos proporcionan realizaciones preferidas de la invención y no significa que limiten el ámbito de las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de un vector replicón derivado de VEE

Para construir vectores de replicón derivado de VEE y casetes de empaquetamiento de auxiliares defectuosos para su uso en la producción de partículas quiméricas, fue necesario sintetizar primero ADN complementario correspondiente a todo el genoma del VEE. Basándose en la secuencia anteriormente publicada de la cepa Burro Trinidad de tipo silvestre del VEE (GENBANK, L01442), (en lo sucesivo, en el presente documento, TRD del VEE) se sintetizó todo el genoma de 11.447 y se clonó en múltiples fragmentos usando oligonucleótidos de solapamiento. Se usaron clones de gen de proteína no estructural para el ensamblaje de un vector replicón, mientras que los clones de gen de proteína estructural se usaron para el ensamblaje de casetes de empaquetamiento de auxiliar defectuoso.

Las secuencias que codifican genes de proteína no estructural del TRD del VEE se analizaron para sitios de escisión de restricción única adecuados que subdividirían la región en fragmentos de una longitud práctica y que pudieran usarse de manera conveniente para el ensamblaje final de la construcción del vector replicón completo. Tal como se muestra en la Figura 1, se identificó un total de 13 fragmentos intermedios, cuya longitud variaba de 334 a 723 nucleótidos. Esta serie de fragmentos se sintetizó usando oligonucleótidos de solapamiento y técnicas normalmente empleadas por los expertos en la materia de biología molecular (véase a continuación, por ejemplo). Para los

fragmentos terminales n.º 1 y n.º 13 se añadieron secuencias adicionales necesarias para la construcción final del plásmido que podría usarse para la transcripción de vectores de expresión replicones de ARN *in vivo* e *in vitro*. Aguas arriba, como parte del fragmento 1, se colocó o un promotor del bacteriófago SP6 o un promotor del CMV eucariota para permitir la transcripción del ARN replicón. Aguas abajo, como parte del fragmento 13, se replicó la UTR 3' vírica, un tramo de poliadenilación de A40 sintético y la ribozima antigenómica del virus de la hepatitis delta para la generación de ARN terminados de manera auténtica (Dubensky y col., J. Virol. 70:508-519, 1996; Polo, 1999, *ibid*).

Como un ejemplo detallado de síntesis génica para uno de los fragmentos, se generaron cadenas completas de ADN dúplex para el fragmento de replicón n.º 2 a partir de oligonucleótidos de solapamiento sintéticos tal como se describe a continuación y como se muestra en la Figura 2 (los oligonucleótidos adyacentes se muestran con o sin sombreado para destacar las uniones). En primer lugar, la cadena completa dúplex se añadió con la secuencia de reconocimiento de sitios de enzimas de restricción convenientes adecuados para la inserción en vectores de clonación intermedios. Después, cada fragmento se subdividió en una serie de oligonucleótidos con una longitud promedio de 60 nucleótidos cada uno, y que solapan con aquellos oligonucleótidos de la cadena opuesta en un promedio de 20 nucleótidos por cada extremo. La síntesis de los oligonucleótidos iniciales la realizó proveedores comerciales (por ejemplo, Integrated DNA Technologies, Coralville, IA; Operon Technologies, Alameda, CA). Se reconstituyeron oligonucleótidos para cada fragmento según las recomendaciones del proveedor para producir soluciones de 100 nM de cada oligo individual. Para ensamblar el fragmento, se mezclaron 100 pmoles de cada oligo en un solo tubo de reacción que contenía también de polinucleótido quinasa T4 (New England Biolabs, Beverly, MA), rATP 1 mM, agua y 10 unidades de enzima polinucleótido quinasa T4 (New England Biolabs, Beverly, MA) en un volumen de reacción final de 500 µl. Se permitió que la reacción de fosforilación procediese durante 30 minutos a 37 °C, momento en el cual la reacción se complementó con 10 unidades más de polinucleótido quinasa T4 y se permitió que continuase durante 30 minutos más. Al final de la reacción, el tubo que contenía la mezcla se calentó a 95 °C durante 5 minutos en un vaso de precipitados que contenía un gran volumen de agua para desnaturalizar la enzima y cualquier cadena de ADN que ya pudiera estar apareada. Después se retiró el vaso de precipitados de la fuente de calor y se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente, para que los oligonucleótidos complementarios se apareasen en cadenas de ADN dúplex completas.

Una vez enfriado, 0,2 pmoles del material que había reaccionado, se unieron con 100 pmoles de ADN del vector lanzadera previamente preparado y transformado en bacterias competentes de acuerdo con procedimientos convencionales. En primer lugar, se analizaron los transformantes que surgieron de esta unión para determinar la presencia de sitios de enzimas de los replicones terminales apropiados, el tamaño de la inserción y evidencias de la duplicación de la inserción. Se eligieron aleatoriamente varias transformaciones positivas y se sometieron a una confirmación de secuencia. Cualquier error de secuencia detectado se corrigió mediante el cambio de fragmentos entre dos o más muestras secuenciadas o mediante mutagénesis dirigida y se volvió a confirmar su autenticidad.

Después de que se obtuviesen todos los fragmentos, el ensamblaje final de un vector replicón, similar a los publicados anteriormente con una variedad de alfavirus (Xiong y col., Science 243:1188-1191, 1989; Dubensky y col., 1996, *ibid*; Liljestrom y col., Bio/Technol. 9:1356-1361, 1991; Pushko y col., Virology 239:389-401), se realizó troceando cada subfragmento junto con su fragmento contiguo a través de la unión a los sitios de escisión del fragmento terminal previamente seleccionado. Una vez ensamblado, se volvió a confirmar la secuencia de todo el replicón del VEE sintético. La construcción resultante de vector de alfavirus basada en VEE a partir de la cual se puede transcribir ARN replicón *in vitro* se denominó pVCR.

Además de la construcción del vector replicón basada en el promotor SP6, también se construyó un sistema eucariota de iniciación de vector en capas basado en VEE (ELVIS, véanse los documentos US 5814482 y 6015686) que utilizó un promotor del CMV para lanzar replicones de ARN funcionales desde una célula eucariota. La modificación del plásmido pVCR para la conversión en un vector de ELVIS se realizó de la siguiente manera. Se usó un vector de ELVIS basado en virus Sindbis (SIN) existente, pSINCP, como una fuente donante para los componentes de la estructura principal apropiados que incluyen el promotor del CMV, el gen de la resistencia a la kanamicina y el origen de replicación. Esta estrategia fue posible debido a que tanto el pSINCP como el pVCR comparten elementos de secuencia idénticos (por ejemplo, secuencia poli(A) sintética, ribozima del HDV) aguas abajo del gen no estructural y las regiones UTR 3' víricas. En el pVCR, la ribozima del HDV está flanqueada por un único sitio *PmeI*, mientras que en el pSINCP la ribozima está flanqueada por un sitio *BclI*. La fusión *PmeI/BclI* sirve después como el sitio de unión a 5' entre pSINCP y pVCR. El sitio de unión a 3' fue un sitio *BspEI* fortuito presente en la nsP1 tanto de SIN como de VEE. Para realizar el intercambio de estructura principal, primero se transformó el pSINCP en una bacteria hospedadora *Dam/Dcm* minus, SCS110 (Stratagene, La Jolla, CA) para obtener ADN que se puede escindir por *BclI*. Se aisló un fragmento de 1203 pares de bases que contenía el BGHT en el extremo 5' y el gen Kan R en el extremo 3' y los extremos se hicieron romos mediante la ADN polimerasa T4 (New England Biolabs, Beverly, MA) siguiendo procedimientos convencionales. Después, este fragmento se digirió adicionalmente con *PstI* para liberar un fragmento de *BclI-PstI* de 999 pb que se purificó, que contenía el BGHT y los 2/3 de 5' del gen Kan R.

El plásmido pSINCP contiene 4 sitios *BspEI*. Para hacer una identificación de fragmento más precisa, el plásmido se codigirió con *NotI*, *SalI* y *Eco47III* y se aisló el fragmento de 5173 pb. Después, este fragmento se digirió adicionalmente con *PstI* y *BspEI* y a partir de éste se purificó un fragmento *PstI-BspEI* de 2730 pb que contenía el 1/3 de 3' del gen Kan R, el origen de replicación del plásmido, el promotor pol II y 420 pb del gen de la nsP1 del

Sindbis.

Como una fuente del extremo 5' y 3' del replicón VCR, se utilizó un intermedio temprano, pVCR-DH (véase a continuación). El pVCR-DH contiene el fragmento 1, el fragmento 13 y todos los sitios de restricción terminal de los fragmentos intermedios. Como tal, contiene una porción del gen de la nsP1 del VEE-TRD que incluye el sitio *BspEI* necesario y todos los rasgos de 3' descritos anteriormente que fueron necesarios para el intercambio, pero carece de la región no estructural del núcleo desde el extremo 3' de la nsP1 hasta el extremo 5' de la nsP4. El pVCR-DH se transformó en células SCS 110 como antes y se digirió con *BspEI* y *PmeI* para liberar un fragmento de 1302 pb que contenía nsP1'-nsP4', la UTR de 3', el tramo de A40 y la ribozima del HDV.

Se realizó una unión de tres vías de los fragmentos *BclI*(romo)-*PstI* y *PstI*-*BspEI* del pSINCP y el fragmento *BspEI*-*PmeI* del pVCR. El intermedio resultante se denominó pVCPdhintSP. El plásmido pVCPdhintSP se digirió con *SacI* (cortando 15 pb antes del extremo 3' del promotor del CMV) y *BspEI* en la unión de las secuencias del Sinbis y del VEE en nsP1. El fragmento del vector de esta digestión se desfosforiló y se unió con un producto de PCR de 326 pb del pVCR-DH que proporciona el extremo 5' ausente de la nsP1 del VEE-TRD. El cebador 5', **[AAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTATGGGCGGCGCATG]**, (SEQ ID NO 1) yuxtapone los 15 nucleótidos del 3' terminal del promotor del CMV (hasta el sitio de inicio de la transcripción) hasta la base inicial de la secuencia UTR 5' del VEE. El cebador 3' tenía la secuencia enumerada [gccctgcgtccagctcatctcga**TCTGTCCGGATCTTCCGC**.] (SEQ ID NO 2). Este intermedio se denominó, pVCPdhintf. Para completar la construcción, el pVCPdhintf se digirió con *NotI* y *HpaI* y el fragmento del vector se desfosforiló y se unió al fragmento *HpaI*-*NotI* del pVCR proporcionando las secuencias no estructurales nucleares del VEE que faltaban a partir del pVCPdhintf intermedio. Esta construcción final de ELVIS basada en VEE se denominó pVCP.

Ejemplo 2

Construcción de construcciones auxiliares defectuosas de alfavirus

Antes de la construcción de auxiliares defectuosos (DH, del inglés, *defective helpers*) para su uso en la generación de elementos de proteína estructural híbridos y partículas de alfavirus quimérico, casetes de empaquetamiento de auxiliares defectuosos basados en SIN previamente existentes (Polo y col., 1999, *ibid*; Gardner y col., 2000 *ibid*) se modificaron en primer lugar. Para generar estos nuevos casetes de SIN, el plásmido SINBV-neo (Perri y col., J. Virol. 74:9802-9807, 2000) se digirió con *Apal*, se trató con ADN polimerasa T4 para hacer romos los extremos generados con *Apal* y después se digirieron con *BglII* y *BamHI*. El fragmento de 4,5 kb, que contenía la estructura principal del plásmido, el promotor subgenómico del SIN, el extremo 3' del SIN, el tramo poli(A) sintético y la ribozima antigenómica de HDV, se purificó en gel con un kit de extracción en gel QIAquick y se unió a un fragmento de 714 pb que contenía un promotor SP6 y un extremo 5' de ARNt del SIN, obtenido del plásmido 47tRNA BBCrrvdel 13 (Frolov y col., J. Virol., 71:2819-2829, 1997) que previamente se había digerido con *SacI*, se había tratado con ADN polimerasa T4, se había digerido con *BamHI* y se había purificado con gel. Los clones positivos se verificaron mediante análisis de restricción. Esta construcción se usó como base para la inserción a través de los sitios *XhoI*-*NotI* (elimina la inserción Neo existente), de las secuencias de glucoproteína y cápside de alfavirus descritas a continuación. La estructura principal del casete de auxiliar defectuoso del SIN descrita en el presente documento se denomina tDH.

Construcción de VCR-DH

En la estructura principal de SINCR-GFP se clonó una región de polienlazador (Gardner y col., 2000, *ibid*) como una primera etapa. El polienlazador contenía los siguientes sitios de restricción de 5' a 3': *Apal*-*MluI*-*HpaI*-*BglII*-*Bsu36I*-*PstI*-*Bsa*-*BI*-*AvrII*-*SwaI*-*AspI*-*BbvCI*-*Ascl*-*NotI*-*PmeI*. Para generar el polienlazador, se usaron los siguientes oligonucleótidos:

PL1F	5'-cacgcgtactactgttaactcatcaagatctactaggcctaaggcaccacctgcaggtagtagatacacatcataataacc-3' (SEQ ID NO 3)
PL2F	5'-tagggcggcgattaaatgatttagactacgtcagcagccctcagcggcgcccccagcggccgcaggatagttt-3' (SEQ ID NO 4)
PL1R	5'-tatgatgtgtatctactacctgcaggtggtgccttaggcctagtagatcttgatgagtaacagtagtacgcgtgggccc-3' (SEQ ID NO 5)
PL2R	5'-aaactatcctgcggccgctgggtggcgccgcctgagggctgctgacgtagtctaaatcatttaaatcggcccttaggtat-3' (SEQ ID NO 6)

Los oligonucleótidos PL1F y PL1R, y los oligonucleótidos PL2F y PL2R se mezclaron en dos reacciones distintas, se fosforilaron, se desnaturalizaron y se aparearon lentamente. Las dos reacciones se mezclaron después y se unieron

con el fragmento de 2,8 kb generado a partir del plásmido SINCR-GFP que previamente se había digerido con *Apal* y *PmeI* y gel purificado usando un kit de extracción en gel QIAquick. Se exploraron los clones para la correcta orientación usando las digestiones de restricción *AlwNI* y *NotI*. Los clones positivos se verificaron con digestión de restricción con cada una de las enzimas presentes en el polienlizador. Esta construcción se denominó estructura principal de VCR. A continuación, el extremo 3' de VEE, junto con un tramo de poliadenilación y la ribozima del HDV, se insertaron en la estructura principal de VCR. Este fragmento se generó usando los siguientes oligonucleótidos sintéticos de solapamiento.

VEE3'-1F 5'-ggccgcatacagcagcaattggcaagctgcttacatagaactcgcggcgattggcatg-3' (SEQ ID NO 7)
 VEE3'-1R 5'-ccaatgccgcgaggtctatgtaagcagctgccaattgctgctgtagc-3' (SEQ ID NO 8)
 VEE3'-2F 5'-ccgcctaaaaatttttttttttctttcttttccgaatcggtttgttttaaat-3' (SEQ ID NO 9)
 VEE3'-2R 5'-attaaaaacaaaatccgattccgaaagaaaagaaaataaaaaatttaagcgcgcatg-3' (SEQ ID NO 10)
 VEE3'-3F 5'-attcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaagggtcgcatgcatctccac-ctctcgcg-3' (SEQ ID NO 11)
 VEE3'-3R 5'-gaccgcgaggagggtggagatgcatcgcgaccttttttttttttttttttttttttttttttttgaat-3' (SEQ ID NO 12)
 VEE3'-4F 5'-gtccgacctggcgcgaaggagacgcacgtccactcgatggctaaggagagcaccgtt-3' (SEQ ID NO 13)
 VEE3'-4R 5'-aacgtggctctccttagcattcccgatggagctgctcctcctcgatgccaggctg-3' (SEQ ID NO 14)

Cada par de oligonucleótidos directo e inverso (por ejemplo, VEE1F con VEE1R, VEE2F con VEE2R, etc) se mezcló, se fosforiló, se desnaturalizó y se apareó lentamente. Después, los 4 pares de oligonucleótidos apareados se mezclaron conjuntamente, se unieron entre sí, se digirieron con enzimas *NotI* y *PmeI*, se purificaron con gel usando un kit de extracción en gel QIAquick y se unieron a la estructura principal de VCR que se había digerido previamente con las mismas enzimas, se había purificado en gel y se había tratado con fosfatasa alcalina de camarón. Los clones positivos para el fragmento se verificaron mediante secuenciación. Esta construcción se denominó VCR-3'drib.

A continuación, se insertó el extremo 5' del genoma del VEE. Este fragmento se generó usando oligonucleótidos de solapamiento para cubrir la región del genoma de la cepa burro Trinidad del VEE (véase la referencia al GENBANK anterior) desde el nucleótido 1 hasta el sitio de restricción *HpaI*. Los cebadores con nucleótido 1 de VEE también contenían un sitio *MluI* aguas arriba seguido del promotor SP6 inmediatamente en 5' del nucleótido 1 del VEE. Todos los oligonucleótidos se mezclaron en una reacción, se fosforilaron, se desnaturalizaron, se alinearon lentamente y se unieron. Tras desactivar la ligasa, el ADN se digirió con las enzimas *MluI* y *HpaI*, se purificó en gel usando el kit de extracción en gel QIAquick y se unió a VCR-3'drib que previamente se había digerido con las mismas enzimas de restricción, se había purificado en gel y se había tratado con fosfatasa alcalina de camarón. Los clones positivos para la inserción se verificaron mediante secuenciación. Esta construcción intermedia se denominó VCR-F1-3'drib.

Finalmente, la región del VEE que contenía el promotor subgenómico se clonó en VCR-F1-3'drib. Esta región (fragmento 13, Figura 1) se corresponde con la secuencia entre el sitio de restricción *SwaI* y el nucleótido 7561 del genoma de la cepa burro Trinidad del VEE. El fragmento se generó usando oligonucleótidos de solapamiento correspondientes a la secuencia de la cepa Burro Trinidad, con la excepción del oligonucleótido correspondiente al extremo 3' del fragmento que se modificó para llevar unos sitios de restricción adicionales (*BbvCI*) para permitir una inserción posterior de secuencias heterólogas bajo el control del promotor subgenómico. Todos los oligonucleótidos se mezclaron en una reacción, se fosforilaron, se desnaturalizaron, se alinearon lentamente y se unieron. Tras desactivar la ligasa, el ADN se digirió con las enzimas *SwaI* y *BbvCI*, se purificó en gel usando el kit de extracción en gel QIAquick y se unió a la estructura principal de VCR que se había digerido previamente con las mismas enzimas de restricción, se había purificado en gel y se había tratado con fosfatasa alcalina de camarón. Los clones positivos para la inserción se verificaron mediante secuenciación y un clon, VF13-14, se reparó posteriormente eliminando una pequeña inserción y volviendo a confirmar mediante secuenciación. A continuación, el clon se digirió cloncon *SwaI-NotI*, el fragmento de 600 pb se purificó en gel usando el kit de extracción en gel y se unió a VCR-F1-3'drib que se había digerido previamente con las mismas enzimas de restricción, se había purificado en gel y se había tratado con fosfatasa alcalina de camarón. Los clones positivos para la inserción se verificaron y la construcción se denominó VCR-DH.

Construcción de tDH-Vgly, tDH-VE2-120 y tDH-V_{NTR}-glyd1160

Los genes de glucoproteína de la cepa burro Trinidad del VEE se generaron usando oligonucleótidos de solapamiento que se denominaron basándose en la secuencia de GENBANK publicada. Para permitir la expresión a partir de casetes de empaquetamiento del vector apropiado, se añadió un codón ATG en fase con la fase abierta de lectura del gen de la glucoproteína inmediatamente antes del primer aminoácido de E3, y se añadieron un sitio *XhoI* y un sitio *NotI* en los extremos 5' y 3', respectivamente, de las secuencias del gen de la glucoproteína. La síntesis del gen se realizó usando PCR de solapamiento para generar cinco fragmentos distintos que abarcaban toda la secuencia de glucoproteína (Figura 3). Los fragmentos se ensamblaron por etapas en un solo fragmento en pGEM usando los sitios de restricción indicados en la Figura 3. Se corrigió una pequeña delección de nucleótidos en los sitios *KasI* mediante mutagénesis dirigida convencional. El clon final se verificó mediante secuenciación y se denominó pGEM-Vgly. Después, la secuencia de gen de la glucoproteína se transfirió desde pGEM a tDH usando los sitios *XhoI-NotI* y el clon final se denominó tDH-Vgly.

De manera análoga, se construyó una construcción similar a tDH-Vgly que también contenía la mutación atenuante en el aminoácido 120 de E2 presente en la cepa del VEE de la vacuna TC83. El plásmido pGEM-Vgly se sometió a mutagénesis dirigida convencional y la mutación 120 de E2 se confirmó mediante secuenciación. Después, la secuencia de la glucoproteína E2-120 del VEE se transfirió desde pGEM a tDH usando los sitios *XhoI-NotI* y la construcción se confirmó mediante secuenciación y se denominó tDH-VE2-120.

El plásmido tDH-V_{NTR}-glyd160 es una construcción auxiliar defectuosa de tDH (véase lo anterior) que contiene una secuencia de glucoproteína del SIN de la cepa trópica de células dendríticas humanas descrita anteriormente (Gardner y col., *ibid*), en la que la NTR 5' subgenómica derivada del SIN y el sitio *XhoI* se sustituyeron por la siguiente secuencia NTR 5' subgenómica del VEE (5'-ACTACGACATAGTCTAGTCCGCAAG) (SEQ ID NO 53). Esta secuencia se insertó de manera que precede inmediatamente al codón de iniciación ATG de la glucoproteína. La construcción también se conoce como tDH-V_{UTR}-glyd160 para reflejar la nomenclatura intercambiable para la región no traducida (NTR, del inglés *nontranslated region*) 5' subgenómica, también denominada región sin traducir (UTR, del inglés *untranslated region*).

Construcción de VCR-DH-Vgly, VCR-DH-VE2-120 y VCR-DH-Sglyd160

La secuencia de gen de glucoproteína del VEE entre el ATG y el sitio de restricción *NcoI* se amplificó mediante PCR usando los siguiente oligonucleótidos.

VGBbvCI	5'-atatatatctcgagcctcagcatgtcactagtaccacatgt-3' (SEQ ID NO 15)
VGNcoIR	5'-atatataaattccatggtgatggagtcc-3' (SEQ ID NO 16)

Tras la amplificación por PCR, el fragmento se digirió con *BbvCI* y *NcoI* y se purificó en gel usando el kit de extracción en gel QIAquick. Por separado, se preparó la región de glucoproteína E2-120 del VEE desde *NcoI* hasta *NotI* digiriendo pGEM-Ve2-120 con estas enzimas seguido de la purificación en gel. Los dos fragmentos se mezclaron y se unieron a VCR-DH que se había digerido previamente con *BbvCI* y *NotI*, se había purificado en gel y se había tratado con fosfatasa alcalina. Los clones positivos para la inserción se verificaron mediante secuenciación y se denominaron VCR-DH-VE2-120. Para obtener VCR-DH-Vgly, se obtuvo el fragmento *NcoI-XbaI* a partir de pGEM-Vgly y se usó para sustituir el mismo fragmento en VCR-DH-VE2-120.

Se obtuvo una glucoproteína de SIN con el fenotipo DC+ humano a partir de un plásmido E3nd160/dIR-RV auxiliar defectuoso, modificado de Gardner y col., (2000, *ibid*) (PCT WO 01/81609). El plásmido E3nd160/dIRRV se digirió con *XhoI*, se trató con un fragmento Klenow para hacer romos los extremos, después se digirió con *NotI*. El fragmento de 3 kb se purificó en gel usando el kit de extracción en gel QIAquick y se unió a VCR-DH que se había digerido previamente con *BbvCI*, se había tratado con fragmento Klenow, se había digerido con *NotI* y se había tratado con fosfatasa alcalina. Un clon positivo para la inserción se denominó VCR-DH Sglyd160. De forma similar, se construyó una construcción de auxiliar defectuoso que contenía las glucoproteínas de la envoltura derivadas de la cepa LP del SIN (Gardner y col. 2000, *ibid*).

Construcción de VCR-DH-Vcap, VCR-DH-Scap y tDH-Vcap

El gen de la cápside de VEE se sintetizó usando oligonucleótidos de solapamiento, también denominados basándose en la secuencia de GENBANK publicada de la cepa de burro Trinidad del VEE, con la adición de un sitio *XhoI* y una secuencia consenso de Kozak adyacente al ATG de la cápside y un sitio *NotI* en el extremo 3'. Los oligonucleótidos se mezclaron y se usaron para una reacción de amplificación por PCR de 25 ciclos. El fragmento generado por PCR se digirió con los sitios de restricción *XhoI* y *NotI*, se purificó en gel y se clonó dentro del vector pBS-SK+. Los clones positivos para la inserción se verificaron mediante secuenciación. Finalmente, la secuencia de la cápside se modificó adicionalmente para insertar un codón de terminación en su extremo 3' mediante amplificación por PCR en una reacción de 25 ciclos con los siguientes oligonucleótidos.

TRDCtR	5'-atatatatgcgccgcttaccattgctcgcagttctccg-3' (SEQ ID NO 17) contiene el codón de terminación en fase con el último aminoácido de la cápside
TRDCtF	5'-gagatgtcatcgggcacgcatgtgtggtcggagggaagttattc-3' (SEQ ID NO 18)

El producto se purificó con el kit de purificación para PCR QIAquick, se digirió con *XhoI* y *NotI* y se unió a la estructura principal del vector tDH que se había preparado previamente mediante digestión con *XhoI* y *NotI*, purificación con gel y tratamiento con fosfatasa alcalina. Los clones positivos para la inserción se verificaron mediante secuenciación y la construcción se denominó tDH-Vcap.

El mismo producto de PCR también se digirió con *XhoI*, se trató con ADN polimerasa T4 para hacer romo el sitio

*Xho*I, se digirió con *Not*I, se purificó con gel y se unió a VCR-DH que se había digerido previamente con *Bbv*CI, se había tratado con ADN polimerasa T4 para hacer romo el sitio *Bbv*CI, se había digerido con *Not*I, se había purificado en gel y se había tratado con fosfatasa alcalina. Los clones positivos para la inserción se verificaron mediante secuenciación y la construcción se denominó VCR-DH-Vcap.

- 5 La secuencia de la cápside del SIN se obtuvo a partir de un auxiliar defectuoso descrito previamente y el fragmento de 800 pb se purificó en gel usando el kit de extracción en gel QIAquick y se unió a VCR-DH que se había digerido previamente con *Bbv*CI, se había tratado con fragmento Klenow, se había digerido con *Not*I y se había tratado con fosfatasa alcalina. Un clon positivo para la inserción se denominó VCR-DH-Scap.

Ejemplo 3

10 **Generación de quimeras de partícula de replicón con proteína de la cápside híbrida**

En el caso de proteínas de la cápside híbrida que usan elementos obtenidos tanto de SIN como de VEE, se construyó una serie de proteínas de la cápside híbrida que contenían la porción amino-terminal (de unión a ARN) del SIN y la porción carboxi-terminal (de interacción con glucoproteínas) del VEE. También se obtuvieron construcciones con las porciones opuestas. El sitio al que tales porciones se fusionaron varió según la construcción y fue necesariamente un factor responsable en las diferencias en la longitud global de estas dos proteínas de la cápside, teniendo la cápside de SIN 264 aminoácidos y la cápside de VEE 275 aminoácidos. Los sitios de fusión para generar los híbridos de la cápside se indican a continuación en la tabla, así como en la Figura 4.

- 15

Nombre de la quimera de la cápside	Extremo terminal NH2	Extremo terminal COOH
S113V	SIN(1-113)	VEE(125-275)
S129V	SIN(1-129)	VEE(141-275)
S127V	SIN(1-127)	VEE(139-275)
S116V	SIN(1-116)	VEE(128-275)
S109V	SIN(1-109)	VEE(121-275)
V141S	VEE(1-141)	SIN(130-264)

Cada una de las construcciones de la cápside híbrida se generó mediante amplificación por PCR de dos fragmentos de solapamiento, uno codificante del extremo amino terminal de la proteína de la cápside del SIN o del VEE, y el otro codificante del extremo carboxi-terminal de la proteína de la cápside del virus opuesto (VEE o SIN, respectivamente).

- 20

Los fragmentos que contienen secuencias de la cápsides del SIN se amplificaron a partir de una construcción de auxiliar defectuoso (Gardner y col., 2000, *ibid*) y los fragmentos que contienen secuencias de la cápside del VEE se amplificaron a partir de la construcción VCR-DH-Vcap (anterior). Se usaron los siguientes oligonucleótidos:

Fragmento	Oligonucleótido 5'	Oligonucleótido 3'
SIN(1-113)	SINntF 5' atatatctcgagccaccatgaatag aggattcttaacatg-3' (SEQ IDNO 19) que contenía el sitio de restricción <i>Xho</i> I (nt. 7-13), la secuencia consenso de Kozak para la traducción óptima de la proteína (nt. 14-18 y la secuencia complementaria a la cápside del SIN (nts. 19-48)	S113R 5' gggaacgtctgtgctgcctccaact taagtg-3' (SEQ ID NO 20) con los nt. 1-10 complementarios a la secuencia de la cápside del VEE y los nt. 11-31 a la secuencia de la cápside del SIN
SIN(1-129)	SINntF	SINntR 5' gaataacttccctcggaccacacat gcgtgccgatgacatctc-3' (SEQ ID NO 21) con los nt. 1-24

ES 2 624 854 T3

(continuación)

Fragmento	Oligonucleótido 5'	Oligonucleótido 3'
		complementarios a la secuencia de la cápside del VEE y los nt. 25-44 a la secuencia de la cápside del SIN
SIN(1-127)	SINNtF	S127R 5' ccacacaagcgtaccgatgacat ctccgtcttc-3' (SEQ ID NO 22) con los nt. 1-13 complementarios a la secuencia de la cápside del VEE y los nt. 14-34 a la secuencia de la cápside del SIN
SIN (1-116)	SINNtF	S116R 5' catgattggaacaatctgtcggcc tccaac-3' (SEQ ID NO 23) con los nt. 1-9 complementarios a la secuencia de la cápside del VEE y los nt. 10-31 a la secuencia de la cápside del SIN
SIN(1-109)	SINNtF	S109R 5' gtcagactccaacttaagtccatgcg-3' (SEQ ID NO 54) con los nt. 1-6 complementarios a la secuencia de la cápside del VEE y los nt. 7-27 a la secuencia de la cápside del SIN.
SIN(130-264)	SINCtF 5' gggaagataaacggctacgctctg gccatggaaggaaagg-3' (SEQ ID NO 25) con los nt. 1-21 complementarios a la secuencia de la cápside del VEE y los nt. 22-40 a la secuencia de la cápside del SIN	SINCtR 5' atatatatgcgccgctcaccactc ttctgtcccttc-3' (SEQ ID NO 26) con el sitio de restricción <i>NotI</i> (nt. 9-16) y los nt. 17-39 complementarios a la secuencia de la cápside del SIN.
VEE(125-275)	TRD125F 5' gccgacaagacgttccaatcatg ttggaag-3' (SEQ ID NO 27) con los nt. 1-9 complementarios a la secuencia de la cápside del SIN y los nt. 10-31 a la secuencia de la cápside del VEE	TRDCtR 5' atatatatgcgccgcttaccattg ctgcagttctccg-3' (SEQ ID NO 28) con el sitio de restricción <i>NotI</i> (nt. 9-16) y los nt. 17-39 complementarios a la cápside del VEE
VEE(141-275)	TRDCtF 5' gagatgtcatcgggcacgcatgtg tggcggagggaagttattc-3' (SEQ ID NO 29) con los nt. 1-20 complementarios a la secuencia de la cápside del SIN y los nt. 21-44 a la secuencia de la cápside del VEE	TRDCtR
VEE(139-275)	TRD139F 5'- tcatcgggtacgcttgtgtggtcg-3' (SEQ ID NO 30) con los nt. 1-8 complementarios a la secuencia de la cápside del SIN y los nt. 9-24 a la secuencia de la cápside del VEE	TRDCtR

ES 2 624 854 T3

(continuación)

Fragmento	Oligonucleótido 5'	Oligonucleótido 3'
VEE(128-275)	TRD128F 5' gacagattgtcccaatcatgttgg aaggg-3' (SEQ ID NO 31) con los nt. 1-11 complementarios a la secuencia de la cápside del SIN y los nt. 12-30 a la secuencia de la cápside del VEE	TRDCtR
VEE(121-275)	TRD121F 5' acttaagttggagtctgacaagacg ttccaatc-3' (SEQ ID NO 32) con los nt. 1-13 complementarios a la secuencia de la cápside del SIN y los nts. 14-34 a la secuencia de la cápside del VEE	TRDCtR
VEE(1-141)	TRDNtF 5' atatatctcgagccaccatgttccc gtccagccaatg-3' (SEQ ID NO 33)	TRDNtR 5'-cctttccttccatggccag agcgtagccggttatcttccc-3' (SEQ ID NO 34)
	con el sitio de restricción <i>Xho</i> I (nt. 7-13), la secuencia consenso de Kozak para la traducción óptima de proteína (nt. 14-18) y los nts. 19-48 complementarios a la secuencia de la cápside del VEE	con los nt. 1-19 complementarios a la secuencia de la cápside del SIN y los nt. 20-40 a la secuencia de la cápside del VEE

Los oligonucleótidos enumerados anteriormente se usaron a una concentración de 2 µM con 0,1 µg del molde apropiado de ADN del plásmido en una reacción de PCR de 30 ciclos, con la polimerasa de Pfu según lo sugerido por el proveedor y con la adición de DMSO al 10 %. El protocolo de amplificación general se ilustra a continuación.

Temperatura (°C)	Tiempo (Min.)	N.º de ciclos
94	2	1
94	0,5	
60	0,5	10
72	2	

5 Los fragmentos amplificados se purificaron con gel de agarosa usando un kit de extracción en gel QIAquick y después se usó una alícuota (1/15) de cada fragmento como molde para una segunda amplificación por PCR. Los dos fragmentos se mezclaron de la siguiente manera y se amplificaron con polimerasa de Vent tal como sugiere el proveedor, con la adición de DMSO al 10 %:

- 10 SIN(1-129)+VEE(141-275)
SIN(1-127)+VEE(139-275)
SIN(1-116)+VEE(128-275)
SIN(1-113)+VEE(125-275)
SIN(1-109)+VEE(121-275)
- 15 VEE(1-141)+SIN(130-264)

Se realizó un ciclo de amplificación por PCR en las siguientes condiciones:

Temperatura (°C)	Tiempo (Min.)	N.º de ciclos
94	2	1
94	0,5	
42	1	1
72	3	

5 Para las fusiones del extremo NH2 terminal del SIN con el extremo COOH terminal del VEE, los cebadores SINntF y TRDCtR, que contenían los sitios de restricción *XhoI* y *NotI*, se añadieron a una concentración de 2 µM y la amplificación por PCR completa se realizó de la siguiente manera:

Temperatura (°C)	Tiempo (Min.)	N.º de ciclos
94	2	1
94	0,5	
60	0,5	30
72	2	

10 El producto de la PCR se purificó usando el kit QIAquick, se digirió con *XhoI* y *NotI*, se purificó en gel a partir de gel de agarosa tal como se describe anteriormente, y se unió al plásmido tDH que también se había digerido con *XhoI* y *NotI* para eliminar la inserción del gen de la cápside existente. Los clones que contenían las inserciones híbridas recién generadas se verificaron mediante secuenciación y las nuevas construcciones de auxiliar defectuoso para su uso en la producción de partículas quiméricas se denominaron tDHS129Vcap, tDHS127Vcap, tDHS116Vcap, tDHS113Vcap y tDHS109Vcap.

15 De forma similar, para las fusiones del extremo NH2 terminal del VEE con el extremo COOH terminal del SIN, los cebadores TRDRntF y SINCtR, que contenían los sitios de restricción *XhoI* y *NotI*, se añadieron a una concentración de 2 µM. La amplificación por PCR se realizó usando las mismas condiciones que anteriormente. Después, este fragmento de la PCR se digirió con *XhoI*, se hicieron romos sus extremos, se digirió con *NotI* y se unió al plásmido VCR-DH-Vcap que se había digerido con *BbvCI*, y se habían vuelto romos sus extremos con *NotI*. Los clones que contenían las inserciones se verificaron mediante secuenciación y la nueva construcción de auxiliar defectuoso se denominó VCR-DH-S129Vcap.

20 Después, se analizó la eficacia de las quimeras de la cápside en cuanto al empaquetamiento del replicón con el vector replicón de alfavirus apropiado y el auxiliar defectuoso de la glucoproteína. Específicamente, las quimeras con el extremo NH2 terminal derivado del SIN y el extremo COOH terminal derivado del VEE se analizaron en cuanto a su capacidad para empaquetar replicones de SIN con glucoproteínas de VEE. Esto se realizó de la siguiente manera. El ADN del plásmido que codifica las quimeras (tDHS129Vcap, tDHS127Vcap, tDHS116Vcap, tDHS113Vcap y tDHS109Vcap) se linealizó con el único sitio de restricción *PmeI* y se usó para la transcripción *in vitro* tal como se describe previamente (Polo y col., 1999, *ibid*). Cada transcrito se contransfectó mediante electroporación en células BHK junto con el ARN auxiliar que expresa las glucoproteínas del VEE y el ARN replicón del SIN que expresa GFP, tal como se describe previamente (Polo y col., 1999, *ibid*). Las células transfectadas se incubaron a 34 °C durante 24 horas, momento en el cual se recogieron los sobrenadantes del cultivo, se aclararon mediante centrifugación, se diluyeron en serie y se usaron para infectar células BHK-21 sin tratar durante aproximadamente 14 horas. La enumeración de las células positivas en GFP permitió la cuantificación de partículas de vector de entrada y la reserva de partículas de vector. Los siguientes datos indican que la eficacia de empaquetamiento para una partícula quimérica de SIN/VEE se puede aumentar de manera bastante drástica, particularmente con la proteína de la cápside híbrida S 113V.

Cápside	Glucoproteína	Replicón	Título de partículas
S129V	VEE	SIN	4e ⁵ UI/ml
S127V	VEE	SIN	2e ⁴ UI/ml
S116V	VEE	SIN	1,6e ⁶ UI/ml
S113V	VEE	SIN	1,1 e ⁷ UI/ml

De forma similar, cada transcrito de quimera se cotransfectó mediante electroporación en células BHK junto con 1) ARN auxiliar que expresa las glucoproteínas con la mutación atenuante E2-120 de tDHVE2-120 y 2) ARN replicón del SIN que expresa GFP. Las células transfectadas se incubaron a 34 °C durante 24 horas, momento en el cual se recogieron los sobrenadantes del cultivo, se aclararon mediante centrifugación, se diluyeron en serie y se usaron para infectar células BHK-21 sin tratar durante aproximadamente 14 horas. La enumeración de las células positivas en GFP permitió la cuantificación de partículas de vector de entrada y la determinación del título para la reserva de partículas de vector replicón. Los siguientes datos confirman que la cápside híbrida puede aumentar de manera espectacular la eficacia de empaquetamiento del replicón del SIN en partículas que contienen glucoproteínas del VEE.

Cápside	Glucoproteína	Replicón	Título de partículas
S129V	VE2-120	SIN	1,6e ⁷ UI/ml
S127V	VE2-120	SIN	5,1e ⁵ UI/ml
S116V	VE2-120	SIN	4,7e ⁷ UI/ml
S113V	VE2-120	SIN	9,3e ⁷ UI/ml
S	VE2-120	SIN	1e ² UI/ml

Experimentos similares con el ARN de VCR-GFP, cotransfectado con ARN auxiliares que codifican la cápside híbrida S129Vcap y las glucoproteínas del SIN, produjeron partículas con títulos promedio de 1,6e⁷ UI/ml lo que demostró la capacidad de esta proteína híbrida para empaquetar ARN de vector derivado del VEE de manera eficaz.

Para maximizar adicionalmente las interacciones del ARN con la cápside y de glucoproteínas con la cápside, se creó una construcción adicional, en la que el gen de la proteína de la cápside híbrida S113V se incorporó en el genoma de un alfavirus quimérico, que comprende el extremo 5', el extremo 3', el promotor subgenómico y los genes de proteína no estructural del SIN y los genes de glucoproteína del VEE.

Para generar tal construcción, un ADNc de la longitud del genoma inicial del SIN del que se puede transcribir ARN infeccioso *in vitro* se generó mediante ensamblaje del replicón y secuencias de gen estructural de la variante del SIN trópica de célula dendrítica humana descrita previamente, SINDCchiron (ATCC n.º VR-2643, registrado el 13 de abril de 1999). Los clones de ADN usados que abarcan todo el genoma del virus SINDCchiron (Gardner y col., *ibid*; WO 00/61772) se ensamblaron usando técnicas convencionales de biología molecular y procedimientos ampliamente conocidos por aquellos expertos en la materia (Rice y col., *J. Virol.*, 61:3809-3819, 1987; y la Patente de Estados Unidos 6015694). El clon genómico del SIN se denominó SINDCSP6gen.

Posteriormente, las proteínas estructurales del SIN existentes se sustituyeron con la cápside híbrida S129Vcapsid y las glucoproteínas del VEE de la siguiente manera. Se generó un fragmento de tDH-S129V que contiene parte de la cápside híbrida mediante amplificación por PCR con los siguientes oligonucleótidos:

ScAatIIF

gccgacagatcggtcgacgtc (SEQ ID NO 55)

Los oligonucleótidos se usaron a una concentración de 2 µM con 0,1 µg de molde de ADN del plásmido apropiado en una reacción de PCR de 30 ciclos, con la polimerasa de Pfu según lo sugerido por el proveedor y con la adición de DMSO al 10 %. El protocolo de amplificación general se ilustra a continuación.

Temperatura (°C) Tiempo (Min) N.º de ciclos

Temperatura (°C)	Tiempo (Min.)	N.º de ciclos
94	2	1
94	0,5	
60	0,5	30
72	2	

5 El fragmento de PCR se purificó en gel usando el kit de extracción en gel QIAquick. Se obtuvo otro fragmento que contenía el fragmento de glucoproteína del VEE a partir de tDHVE2-120 mediante digestión con *SpeI* y *PmeI* y purificación en gel. Los dos fragmentos se mezclaron y se unieron a un fragmento de 11 kb obtenido a partir del clon de SINDCSP6gen mediante digestión con *SpeI* y *PmeI*, purificación en gel y tratamiento con fosfatasa alcalina de camarón. Los clones positivos para las inserciones se confirmaron mediante secuenciación y este intermedio se denominó SrS129VcVg-interm. Para restaurar el extremo 3' auténtico en el clon genómico, se regeneró el fragmento *PsiI*-*PsiI* mediante PCR con los siguientes oligonucleótidos

10 *PsiI*FdIN

5'ATATATATTTATAATTGGCTTGCTGGCTACTATTGTGGCCATGTACGTGCTGACCAACCAGAAACATAATTG
ACCGCTACGCCCAATGATCC-3'(SEQ.ID. NO. 53)

*Psi*R

15 5'-GGCCGAAATCGGCAAATCCC-3'(SEQ. ID. NO. 54)
a una concentración de 2 µM con 0,1 µg de ADN de plásmido de clon infeccioso en una reacción de PCR de 30 ciclos, con polimerasa de Vent tal como sugiere el proveedor y con adición de DMSO al 10 %. El protocolo de amplificación general se ilustra a continuación.

Temperatura (°C)	Tiempo (Min.)	N.º de ciclos
94	2	1
94	0,5	
60	0,5	30
72	2	

20 El fragmento se digirió con *PsiI*, se purificó en gel y se unió a SrS129VcVg-interm que también se había digerido con *PsiI*, se había purificado en gel y se había tratado con fosfatasa alcalina de camarón. Los clones positivos para la inserción se confirmaron mediante secuenciación y la construcción final se denominó SrS129VcVg.

Para construir un clon de ADNc de longitud completa similar que contenga la cápside híbrida S113V, se generó un fragmento que contenía parte de las secuencias del SIN aguas arriba del gen de la cápside y del gen que codifica los aa 1-113 usando los siguientes oligonucleótidos

25 Sic7082F

5'-CACAGTTTTGAATGTTTCGTTATCGC-3'(SEQ. ID. NO. 55)

S113R (véase lo anterior)

30 a una concentración de 2 µM con 0,1 µg de la construcción SINDCSP6gen en una reacción de PCR de 30 ciclos, con la polimerasa de Pfu según lo sugerido por el proveedor y con la adición de DMSO al 10%. El protocolo de amplificación general se ilustra a continuación.

Temperatura (°C) Tiempo (Min.) N.º de ciclos

Temperatura (°C)	Tiempo (Min.)	N.º de ciclos
94	2	1
94	0,5	
60	0,5	30
72	2	

- 5 El fragmento se purificó en gel usando el kit de extracción en gel QIAquick y 1/10 de la reacción se mezcló con el fragmento VE(141-275) (véase lo anterior, la construcción de todos los genes de cápside híbrida). Se realizó un ciclo de amplificación por PCR en las siguientes condiciones:

Temperatura (°C) Tiempo (Min.) N.º de ciclos

Temperatura (°C)	Tiempo (Min.)	N.º de ciclos
94	2	1
94	0,5	
42	1	1
72	3	

Después se añadieron los oligonucleótidos Sic7082F y TRDCtR a una concentración de 2 µM y la amplificación por PCR completa se realizó de la siguiente manera:

Temperatura (°C) Tiempo (Min.) N.º de ciclos

Temperatura (°C)	Tiempo (Min.)	N.º de ciclos
94	2	1
94	0,5	
60	0,5	30
72	2	

- 10 El producto de la PCR se purificó usando el kit QIAquick, se digirió con *Bst*Z171 y *Sap*I, se purificó en gel a partir de gel de agarosa tal como se describe anteriormente y se unió a dos fragmentos generados a partir del plásmido SrS129VcVg que también se habían digerido con *Bst*Z171 y *Sap*I para eliminar la inserción de gen de la cápside existente. Los clones que contenían las inserciones híbridas recién generadas se verificaron mediante secuenciación y la nueva construcción se denominó SIN113CVgly.
- 15 Para generar virus, la construcción SIN113CVgly se linealizó con *Pme*I, se transcribió *in vitro* usando polimerasa de SP6 y el ARN se transfectó en células BHK. La progenie del virus se recogió y se realizaron pases en células, aumentando el título infeccioso a niveles que alcanzaron 10⁹ UFP/ml. Una reserva purificada sin placa de este virus SIN quimérico, denominado virus SIN113CVgly (depositado el 31 de mayo de 2001 en la ATCC, PTA-3417), se usó después como la fuente de ARN para la clonación y la secuenciación mediante técnicas convencionales de biología molecular (por ejemplo, las descritas anteriormente) para identificar determinantes genéticos adicionales que proporcionan este alto nivel de empaquetamiento de partículas quiméricas. Los determinantes genéticos individuales se vuelven a incorporar fácilmente en las construcciones de empaquetamiento de replicón y auxiliar defectuoso usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.
- 20 Se entiende que la reserva purificada sin placa de virus SIN quimérico depositada con número ATCC puede contener numerosos genotipos y fenotipos no desvelados de manera específica en el presente documento. Los expertos en la materia podrían aislar fácilmente fenotipos y o genotipos individuales usando técnicas de purificación de placa y secuenciar el SIN quimérico aislado usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia y desvelados en el presente documento.
- 25

Ejemplo 4**Generación de quimeras de partícula de replicón de alfavirus con glucoproteínas híbridas**

5 En el caso de una glucoproteína de la envoltura híbrida que usa elementos obtenidos tanto del SIN como del VEE, se construyeron glucoproteínas E2 híbridas que contenían la cola citoplasmática (por ejemplo, porción de unión a la cápside) del SIN y las porciones transmembrana y ectodominio del VEE. También se pueden obtener construcciones adicionales con las porciones opuestas. En algunas realizaciones, también puede ser deseable incluir híbridos tanto de glucoproteínas E2 como de E1 e incluir híbridos que abarcan el dominio transmembrana.

10 Para demostrar un aumento de la eficacia de empaquetamiento de partículas quiméricas usando tales híbridos de glucoproteína, se construyó una glucoproteína modificada derivada de VEE en la que la cola de E2 se sustituyó con la cola citoplasmática de E2 derivada del SIN. La fusión se realizó en el resto de cisteína conservado (el resto de aminoácido 390, en la E2 tanto del VEE como del SIN) que está en el límite entre el dominio transmembrana y la cola citoplasmática (Figura 5). La construcción de quimera se generó mediante amplificación por PCR de dos fragmentos de solapamiento, uno de los cuales incluía parte de la secuencia de glucoproteína E2 del VEE aguas arriba de la cola citoplasmática y parte de la cola citoplasmática de E2 del SIN. El segundo fragmento incluía parte de la cola citoplasmática de E2 del SIN y proteína 6K del VEE.

15 El primer fragmento se amplificó a partir de la construcción VCR-DH-Vgly usando los siguientes oligonucleótidos:

VE2F: 5'-atatatcaggggactccatccacatgg-3' (SEQ ID NO 35) (los nts 7-27 son complementarios a la glucoproteína del VEE e incluyen el sitio *Ncol*)

20 VSGE2R: 5'-gggattacggcgtttggggccagggcgtatggcgtcaggcactcacggcgcttt gcaaacagccaggtagacgc-3' (SEQ ID NO 36)

(los nts 1-56 son la secuencia de cola citoplasmática de E2 del SIN, y los nts. 57-77 son complementarios a la secuencia de la glucoproteína del VEE)

El segundo fragmento se amplificó a partir del mismo plásmido, usando los siguientes cebadores:

VSGE3F:

25 5'gccccaacgcccgaatcccaactcgcctggcactcttctgctgcttaggtcggccaatgctgagaccacctgggagtcctt g-3' (SEQ ID NO 37)

(los nts. 1-63 se corresponden con parte de la secuencia de cola citoplasmática de E2 del SIN y los nts 64-84 son complementarios a las glucoproteínas del VEE)

VEE3'-1R: 5'-ccaatcgccgcgagttctatgaagcagcttgccaattgctgctgtatgc-3' (SEQ ID NO 38) (complementario a VCR-DH Vgly aguas abajo de la fase de lectura abierta de la glucoproteína)

30 Los oligonucleótidos enumerados anteriormente se usaron a una concentración de 2 μ M con 0,1 μ g de molde de ADN del plásmido VCR-DH-Vgly en una reacción de PCR de 30 ciclos con polimerasa de Pfu tal como sugiere el proveedor, con la adición de DMSO 10 %. El protocolo de amplificación se muestra a continuación.

Temperatura (°C)	Tiempo (Min.)	N.º de ciclos
94	2	1
94	0,5	
60	0,5	30
72	2	

35 Los dos fragmentos amplificados se purificaron a partir de gel de agarosa usando el kit de extracción en gel de QIAquick y después se usó una alícuota (1/10) de cada fragmento como moldes para una segunda amplificación por PCR. Los dos fragmentos se mezclaron con polimerasa de Pfu tal como sugiere el proveedor con la adición de DMSO al 10 %. Se realizó un ciclo de amplificación por PCR:

Temperatura (°C)	Tiempo (Min.)	N.º de ciclos
94	2	1
94	0,5	
42	1	1
72	3	

Después se añadieron los cebadores VE2NtF y VEE3'-1R a concentración 2 µM u la amplificación por PCR se realizó de la siguiente manera:

Temperatura (°C)	Tiempo (Min.)	N.º de ciclos
94	2	1
	0,5	
60	0,5	30
72	2	

5 El producto de la PCR se purificó usando el kit QIAquick, se digirió con *NcoI* y *NotI*, se purificó con gel a partir de gel de agarosa tal como se describe anteriormente y se unió al plásmido tDH-Vgly que también se había digerido con *NcoI* y *NotI* y se había purificado a partir de gel de agarosa. Los clones que contienen las inserciones se verificaron mediante secuenciación y la construcción se denominó tDH-VglySE2tail.

10 Para demostrar el mayor empaquetamiento de partículas generado con tal quimera de glucoproteína, el plásmido de ADN tDH-VglySE2tail se linealizó con la única enzima de restricción *PmeI* y ARN transcrito *in vitro*. El ARN se cotransfectó junto con ARN replicón de SINCR-GFP y el ARN auxiliar defectuoso que codifica proteína de la cápside del SIN. Las células transfectadas se incubaron a 34 °C durante 24 horas, momento en el cual se recogió el sobrenadante del cultivo, se aclararon mediante centrifugación, se diluyeron en serie y se usaron para infectar
 15 células BHK-21 sin tratar durante aproximadamente 14 horas. Los títulos de las partículas se determinaron usando análisis de citometría de flujo y dieron 2e³ UI/ml. Este resultado demuestra que se están produciendo alguna interacción de baja eficacia entre la quimera de la glucoproteína y la cápside del SIN.

20 Para aumentar adicionalmente la eficacia de empaquetamiento de partículas quiméricas con una glucoproteína híbrida, se generaron construcciones adicionales. Los alineamientos de las colas citoplasmáticas del VEE y del SIN (Figura 5) muestran diferencias en 10 restos, cuatro de los cuales son cambios conservativos. De manera interesante, los restos en las posiciones 394 y 395 están cargados en la glucoproteína del SIN, mientras que son hidrófobos en el VEE. Tal diferencia puede afectar a la funcionalidad de E2. Se usó mutagénesis dirigida que utiliza un procedimiento de amplificación por PCR para cambiar los dos restos en la construcción tDH-VglySE2tail de la siguiente manera:

Nombre	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Oligos mutagénicos
tDH-M1 (SEQ ID NO 39)	A ₂₁₅₁ por C	Glu ₃₅₉ por Ala	M1R 5'GTATGGCGTCA GGCACGCACGGC GCGCTTTG-3' (SEQ ID NO 39) M1F 5' AGCGCGCCGT GCGTGCCTGACG CCATACGCC-3' (SEQ ID NO 40)

(continuación)

Nombre	Cambio de nucleótido	Cambio de aminoácido	Oligos mutagénicos
tDH-M2 (SEQ ID NO 40)	C ₂₁₄₇ por G y G ₂₁₄₈ por T	Arg ₃₉₄ por Val	M2R 5' ATGGCGTCAG GCACTCAACGCG CGCTTT GC AAAA C-3' (SEQ IDNO 41) M2F
			5 TTTGC AAAGCG CGCGTTGAGTGC CTGACGCCATAC -3' (SEQ IDNO 42)
tDH-M3	A ₂₁₅₁ por C, C ₂₁₄₇ por G, y G ₂₁₄₈ por T	Arg ₃₉₄ -GLU ₃₉₅ por Val- Ala	M3R 5' ATGGCGTCAG GCACGCAACGCG CGCTTT GC AAAA C-3' (SEQ IDNO 43) M3F 5' TTTGC AAAGCG CGCGTTGCGTGC CTGACGCCATAC -3' (SEQ IDNO 44)

Las construcciones en las que se realizó mutagénesis se verificaron mediante secuenciación. Para cuantificar el empaquetamiento mediante estos nuevos híbridos de glucoproteína, los ADN del plásmido se linealizaron con la única enzima de restricción *PmeI* y se transcribieron *in vitro*. Después, cada ARN mutante se cotransfectó junto con el ARN replicón de SINCR-GFP y ARN auxiliar defectuoso que codifica la cápside del SIN. Las células transfectadas se incubaron a 34 °C durante 24 horas, momento en el cual se recogió el sobrenadante del cultivo, se aclararon mediante centrifugación, se diluyeron en serie y se usaron para infectar células BHK-21 sin tratar durante aproximadamente 14 horas para el análisis de título. Los títulos de las partículas se determinaron usando análisis de citometría de flujo y se observó que la eficacia de empaquetamiento aumentó aproximadamente 7 veces con M1.

Como alternativa, y de manera similar al enfoque de la cápside, fue posible sustituir la quimera de la cola del SIN VEEglyco-E2 en un clon de ADNc de alfavirus de longitud completa a partir del cual se puede obtener el virus infeccioso, y usar el genoma del virus quimérico para seleccionar de manera natural las variantes de partícula quimérica que surgen con una elevada eficacia de empaquetamiento adicional. Un fenotipo de placa de gran tamaño puede ser indicativo de virus de alto título. Esta quimera infecciosa se construyó de la siguiente manera. Mediante PCR, se generó un fragmento que contenía principalmente la secuencia de la cápside del SIN para tener algunos nucleótidos añadidos a su extremo 3' que se corresponde con la secuencia de glucoproteína del VEE y que contenía el sitio de restricción de *SpeI*. Este fragmento se amplificó a partir de una construcción de clon infeccioso del SIN trópico del DC humano (Gardner y col., *ibid*) con los siguientes cebadores:

ScAatIIIF: 5'-gccgacagatcggtcgacgtc-3' (SEQ ID NO 45)

ScVgIR: 5'-atatataggtcactagtgaccactctctgtccctccg-3' (SEQ ID NO 46)

Estos oligonucleótidos se usaron a una concentración de 2 µM con 0,1 µg de molde de ADN del plásmido en una reacción de PCR de 30 ciclos con polimerasa de Pfu tal como sugiere el proveedor con la adición de DMSO al 10 %. El protocolo de amplificación se muestra a continuación.

Temperatura (°C)	Tiempo (Min.)	N.º de ciclos
94	2	1
94	0,5	

(continuación)		
Temperatura (°C)	Tiempo (Min.)	N.º de ciclos
60	0,5	30
72	2	

5 El fragmento amplificado (450 pb) se aclaró usando el kit de purificación por PCR QIAquick, se digirió con *AatII* y *SpeI*, se purificó en gel usando el kit de extracción en gel QIAquick. Se generó un fragmento (3,4 kb) que contiene la cola de E2 de la glucoproteína del SIN del VEE y la UTR 3' del SIN mediante digestión por restricción de tDH-VE2Stail usando las enzimas *SpeI-PmeI* y purificación en gel con el kit de extracción en gel QIAquick. Este fragmento y el fragmento de la PCR se mezclaron y se unieron junto con ADN del plásmido del clon infeccioso que también se había digerido con *AatII* y *PmeI*, se había tratado con fosfatasa alcalina de camarón y se había purificado en gel. Los clones positivos para la inserción se verificaron mediante secuenciación. Finalmente, para restaurar el extremo 3' del clon de longitud completa auténtico, se regeneró el fragmento *Psil-Psil* tal como se describe para SrS129VcVg y la nueva construcción se denominó SrcVgSE2t.

10 SrcVgSE2t se linealizó con la única enzima de restricción *PmeI* y se transcribió *in vitro*. El ARN se transfectó en células BHK. Las células transfectadas se incubaron a 37°C durante 24 horas, momento en el cual se recogió el sobrenadante del cultivo, se aclaró mediante centrifugación y se usó para infectar células BHK-21 sin tratar. Aproximadamente 24 horas después de la infección se recogió el sobrenadante, se aclaró mediante centrifugación y se usó para infectar de nuevo células BHK-21 sin tratar. A las 24 horas después de la infección se observaron algunas placas de virus, de manera que se recogió el sobrenadante, se aclaró y se usó para infectar dos matraces de BHK sin tratar. Las células de un matraz se recogieron 16 horas después de la infección y el ARN total se extrajo usando Trizol (Gibco-BRL). Se permitió que continuase la infección en el otro matraz durante otras 8 horas y se observaron efectos citopáticos importantes en las células que indicaron que se habían producido grandes cantidades de virus.

15 El ARN total extraído de las células infectadas se usó para amplificar y clonar las secuencias de la cápside y de glucoproteína usando RT-PCR. La transcripción inversa se cebó con poli(dT) o con el cebador específico VglyR: 5'-atatatcgccgcccagcattatgtttctggtggtcag-3' (SEQ ID NO 47) El ADNc se usó después para la amplificación por PCR de la secuencia de la cápside con los cebadores SINntF, que contiene un sitio *XhoI*, y SINcTR, que contiene un sitio *NotI*, y de la secuencia de la glucoproteína con los cebadores VglyR que contienen un sitio *NotI* y VglyF: 5'-atatatctcgagccgcccagcctatgtcactagtgtgaccac-3' (SEQ ID NO 48) que contiene un sitio *XhoI*. Ambos fragmentos se aclararon usando un kit de purificación por PCR QIAquick, se digirieron con *XhoI* y *NotI*, se purificó en gel usando el kit de extracción en gel QIAquick y se unió independientemente a tDH que previamente se había digerido con *XhoI* y *NotI*, se había purificado en gel y se había tratado con fosfatasa alcalina de camarón. Se secuenciaron diez clones para el fragmento de la cápside para identificar la(s) posible(s) mutación(es) adaptativa(s). Sin embargo, no se descubrieron mutaciones en la región de la cápside que indicasen que tales mutaciones solo se dan en las secuencias de glucoproteína o que, dado que el ARN procedía de placas sin purificar, los 10 clones no representaron de manera completa toda la población adaptada.

20 La repetición del mismo análisis en ARN derivado de 5 placas víricas individuales aun no condujo a la identificación de mutaciones adaptativas de la cápside. La secuencia de la glucoproteína de una placa (P3) reveló la presencia de dos cambios de aminoácidos en las posiciones 380 (Val por Gly) y 391 (Lys por Arg). De manera interesante, el aminoácido 380 se conserva entre el Sindbis y al menos tres cepas del VEE (TRD, MAC10 y 6119) y el aminoácido 391, que es el primer resto de la cola citoplasmática, es una Lys en las secuencias de glucoproteína del SIN y MAC 10 y 6119 pero es una Arg en la cepa TRD. Esto podría indicar que la localización de estos restos desempeña un papel en la correcta conformación de la membrana-cola citoplasmática, que podría estabilizar las interacciones entre las glucoproteínas y la cápside y se podría aprovechar adicionalmente.

25 Para analizar si esta doble mutación podría aumentar la eficacia del empaquetamiento, se intercambió un fragmento de 998 pb (*NcoI-MfeI*) que contiene ambas mutaciones en tDH-VglySE2tail, generando tDH-VglySE2tail-P3. Después, el ADN del plásmido tDH-VglySE2tail-P3 se linealizó con la única enzima de restricción *PmeI* y ARN transcrito *in vitro*. El ARN se cotransfectó junto con el ARN replicón de SINCR-GFP y ARN auxiliar defectuoso que codifica la proteína de la cápside del SIN. Las células transfectadas se incubaron a 34 °C durante 24 horas, momento en el cual se recogió el sobrenadante del cultivo, se aclararon mediante centrifugación, se diluyeron en serie y se usaron para infectar células BHK-21 sin tratar durante aproximadamente 14 horas. Los títulos de las partículas se determinaron usando análisis de citometría de flujo y la eficacia de empaquetamiento aumentó 50 veces con respecto a VglySE2tail. También, en el contexto de una glucoproteína del VEE híbrida que contiene SE2tail y la mutación atenuante E2-120 del VEE (VE2-120/SE2tail), las mutaciones P3 aumentaron la eficacia de empaquetamiento 200 veces.

Ejemplo 5**Generación de quimeras de partícula de replicón de alfavirus con señal de empaquetamiento híbrida**

Para generar un sistema de empaquetamiento altamente eficaz para un replicón del VEE en las proteínas estructurales del virus Sindbis, la señal de empaquetamiento de ARN bien definida del SIN se insertó en diversos puntos en un replicón del VEE. Para esta tarea, la señal de empaquetamiento del núcleo de 132 nucleótidos (nt.) del SIN se insertó independientemente en cada uno de los tres sitios diferentes (Figura 6) en el replicón VEE-TRD construido en el Ejemplo 1. Se generaron cuatro replicones quiméricos. Chimera-1A y Chimera-1B fueron los nombres dados a las construcciones en las que se insertó la señal de empaquetamiento del SIN en el extremo 3' del gen de la nsP4 de VEE-TRD, justo antes del codón de terminación de nsP4. El replicón de Chimera-2 contiene la señal de empaquetamiento del SIN en fase, en el extremo C-terminal de nsP3, sustituyendo al nivel de nucleótido por un segmento de 102 pb de nsP3. Finalmente, el replicón de Chimera-3 resulta de la inserción de la señal de empaquetamiento del SIN al final de nsP3, justo antes del codón de terminación de nsP3.

Los inventores también contemplan que las enseñanzas del presente documento pueden proporcionar una oportunidad única para modificar replicones y sistemas eucariotas de iniciación de vectores en capas derivados de cualquier alfavirus de NBS-3 (por ejemplo, VEE), de manera que se puedan tratar como construcciones de NBS-2 o NBS-1 reduciendo la secuencia de nucleótidos derivada del virus parental a menos de dos tercios de la longitud del genoma.

A) Chimera-1A, 1B:

Un factor complicado para la construcción de estas quimeras se basa en el hecho de que el promotor subgenómico de todos los alfavirus se solapa con aproximadamente los últimos 100 nucleótidos de nsP4. Para colocar la señal de empaquetamiento del SIN al final de la nsP4 mientras se mantiene un promotor subgenómico funcional en el vector replicón para dirigir la expresión del gen heterólogo, fue necesario alterar el uso de codones de los últimos 80 nt. de la nsP4 (aguas arriba de la secuencia del SIN insertada) para eliminar su capacidad de unirse al complejo replicasa. Al mismo tiempo, la región del promotor subgenómico del VEE se reconstituyó aguas abajo del codón de terminación de nsP4 duplicando la secuencia natural de una porción del extremo 3' de nsP4 pensada para ser parte de la secuencia de reconocimiento del promotor subgenómico. Chimera-1A y 1B se diferencian en la longitud de la secuencia de nsP4 reconstituida que se volvió a añadir para generar un promotor subgenómico funcional: hasta -80 para CHIMERA-1A (Figura 7), hasta -98 para CHIMERA-1B (Figura 8).

Chimera-1A y 1B se prepararon mediante la escisión de pVCR-DH, una construcción intermedia de la fase de reensamblaje de la construcción pVCR descrita (anteriormente), con *MscI* y *Ascl*. En este vector se insertaron cualquiera de los dos oligonucleótidos sintéticos tripartitos que codifican, tal como se describe anteriormente, aproximadamente los últimos 80 pb de nsP4 con el uso de codones no naturales, seguido de la señal de empaquetamiento del SIN (en fase) y el codón de terminación de nsP4, seguido de los 80 o 98 pb terminales duplicados de la secuencia natural de la nsP4. Los oligonucleótidos se diseñaron para proporcionar cadenas dúplex completas sintéticas que se trataron de la misma manera que la descrita anteriormente para la síntesis de replicón. Los clones de esta unión verificados mediante secuenciación se digirieron con *MscI* y *Ascl*, y el fragmento de oligo que lleva la señal de empaquetamiento del SIN se sustituyó en el fragmento del vector de pVCR, digerido de manera similar. Las construcciones finales resultantes de cada uno se denominaron pVCR/CHIMERA-1A y pVCR/CHIMERA-1B. Para evaluar la funcionalidad de estas construcciones, el gen de GFP se clonó en cada una usando los únicos sitios *BbvCI* y *NotI* aguas abajo del promotor subgenómico y las construcciones se denominaron VCR-Chim1A-GFP y VCR-Chim1B-GFP, respectivamente.

B) Chimera 2:

Chimera-2 se preparó mediante escisión del ensamblaje intermedio del replicón del VEE, pCMVkm2-(del *XhoI/CeII*)-VEE 9/10, del ejemplo 1, que codifica una porción de nsP3 y nsP4 del VEE unida mediante los sitios *MamI* y *BlnI* del replicón. La escisión de *XhoI* de este vector elimina un segmento de 102 pb de la nsP3 del VEE. En este vector escindido se insertó un producto de PCR que consiste en la señal de empaquetamiento flanqueada por los sitios *XhoI* terminales, en fase (Figura 9). El molde para esta amplificación fue pSINCP y la ADN polimerasa de Pfu se usó con los siguientes cebadores de oligonucleótidos.

5' Pr: 5'-ATATCTCGAGAGGGATCACGGGAGAAAC-3' (SEQ ID NO 49)

3' Pr: 5'-AGAGGAGCTCAAATACCACCGGCCCTAC-3' (SEQ ID NO 50)

Los clones resultantes se validaron con respecto a su secuencia y orientación. Un clon positivo se digirió con *MamI-BlnI* para generar un fragmento usado para sustituir el segmento *MamI-BlnI* de pVCR. El plásmido resultante se denominó pVCR/CHIMERA-2. El gen GFP se clonó en este vector tal como se describe anteriormente para pVCR/CHIMERA-1A, -1B, generando VCR-Chim2-GFP. Se debería apreciar que la región de delección en la nsP3 se seleccionó basándose en sitios de endonucleasa de restricción convenientes en la construcción de ADN del plásmido. En la presente invención también se contemplan delecciones que eliminan regiones más largas de la nsP3 y un experto en la materia puede realizar fácilmente dichas delecciones.

C) Chimera-3:

Chimera-3 se preparó mediante modificación de un fragmento de replicón del ejemplo 1, pCR2-9057b, que contenía una porción de fragmentos 9 + 10 de replicón, que codifica la región de la unión de la nsP3 y la nsP4 del VEE. La inserción del sitio de empaquetamiento del SIN se realizó mediante PCR de solapamiento usando ADN polimerasa de Pfu y dos conjuntos de cebadores que amplificaron dos productos a través de la unión en pCR2-9057b y que añadieron las colas de la secuencia de señal de empaquetamiento del SIN a los productos resultantes. De manera similar, la señal de empaquetamiento del SIN se amplificó a partir de pSINCP con cebadores que añadieron las colas de secuencia de nsP3 y nsP4, respectivamente, a los extremos 5' y 3' del producto. Véanse las Figuras 10 y 11 para el detalle de esta estrategia que incluye secuencias de cebador. Los tres productos de PCR se diluyeron, se mezclaron, se desnaturalizaron, se volvieron a aparear y se extendieron con ADN polimerasa de Pfu para crear un molde de solapamiento quimérico para la amplificación utilizando los cebadores externos 5' y 3' de nsP3 y nsP4. Este producto se digirió con *XbaI* y *MluI* y se clonó en un vector de clonación intermedio digerido de manera similar, pCMVkm2 (zur Megede, J. Virol. 74:2628, 2000). Para colocar la quimera en el contexto de pVCR, el intermedio pCMVkm2/CHIMERA-3 se digirió con *MamI* (5') y *SacI* (3') y se co-unió con un fragmento *SacI* -*BlnI* de pVCR (nt. 5620-6016 de pVCR) en el fragmento del vector *MamI/BlnI* de pVCR. La construcción resultante se denominó pVCR/CHIMERA-3. El gen GFP se clonó en este vector tal como se describe anteriormente para pVCR/CHIMERA-1A, -1B, generando VCR-Chim3-GFP.

Para analizar la capacidad de estas construcciones para empaquetarse mediante proteínas estructurales del Sindbis, los plásmidos VCD-Chim1A-GFP, VCR-Chim1B-GFP, VCR-Chim2-GFP y VCR-Chim3-GFP se linealizaron con la única enzima de restricción *PmeI* y ARN transcrito *in vitro*. El ARN se cotransfectó junto con ARN auxiliares defectuosos que codifican la cápside y las glucoproteínas del SIN de las construcciones VCR-DH-Sglyd160 y VCR-DH-Scap también linealizadas con *PmeI*. Las células transfectadas se incubaron a 34°C durante 24 horas, momento en el cual se recogieron los sobrenadantes del cultivo, se aclararon mediante centrifugación, se diluyeron en serie y se usaron para infectar células BHK-21 sin tratar durante aproximadamente 14 horas. Los títulos de las partículas se determinaron usando análisis de citometría de flujo. Los siguientes resultados muestran que tres quimeras se pueden empaquetar de manera eficaz mediante las proteínas estructurales del SIN. Chimera 1A no expresó GFP y no se determinó si esto se debía a un defecto en la transcripción subgenómica o en la replicación de ARN.

Replicón	Proteínas estructurales	Títulos
VCR-Chimera1A	SIN	0
VCR-Chimera1B	SIN	3,8E ⁷ UI/ml
VCR- Chimera 2	SIN	9,6E ⁷ UI/ml
VCR-Chimera1A	SIN	3E ⁷ UI/ml

Construcción de Chimera 2.1

Para reducir adicionalmente la cantidad de secuencia de virus VEE parental presente en el replicón pVCR-Chimera2, la secuencia NTR 3' (también conocida como secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural o UTR 3') del VEE se eliminó por completo y se sustituyó por la NTR 3' del SIN. El plásmido SINCR-GFP (Garner y col., 2000) se digirió con *NotI* y *PmeI*, el fragmento de 466 pb se purificó en gel usando el kit de extracción en gel QIAquick y se unió tanto a pVCR-Chimera2 como a VCR-Chim2-GFP que se había digerido anteriormente con *NotI* y *PmeI*, se había purificado en gel y se había tratado con fosfatasa alcalina de camarón. Los clones positivos se verificaron y las construcciones se denominaron VCR-Chim2.1 y VCR-Chim2.1-GFP. Estas construcciones ahora se diferencian del genoma del virus VEE parental por la delección de múltiples secuencias del VEE (por ejemplo, región de nsP3, genes de proteína estructural, NTR 3').

Para analizar la funcionalidad de la nueva configuración del vector replicón quimérico, el plásmido VCR-Chim2.1-GFP se linealizó con la única enzima de restricción *PmeI* y ARN transcrito *in vitro*. El ARN se cotransfectó junto con ARN auxiliares defectuosos que codifican la cápside y las glucoproteínas del SIN de las construcciones VCR-DH-Sglyd160 y VCR-DH-Scap también linealizadas con *PmeI*. Las células transfectadas se incubaron a 34 °C durante 24 horas, momento en el cual se recogieron los sobrenadantes del cultivo, se aclararon mediante centrifugación, se diluyeron en serie y se usaron para infectar células BHK-21 sin tratar durante aproximadamente 14 horas. Los títulos de las partículas se determinaron usando análisis de citometría de flujo y fueron los mismos títulos que VCR-Chim2-GFP, demostrando que la delección de la NTR 3' natural y la sustitución con una NTR 3' de alfavirus heterólogo (por ejemplo, NTR 3' del SIN) mantiene la funcionalidad en el replicón del VEE.

Como alternativa, como medio para reducir las secuencias globales derivadas del VEE en VCR-Chimera2, se redujo la NTR 3' a la secuencia mínima que contiene las CSE conservadas de 19 nt. Tal NTR 3' modificada se generó usando oligonucleótidos de solapamiento:

Vred2F	5'-ggccgcttttctttccgaatcgattttgttttaaat-3'
Vred2R	5'-attaaaaacaaaatccgattcggaaaagaaaagc-3'
VEE3F	véase la construcción VCR-DH para secuencias de oligonucleótidos
VEE3R	
VEE4F	
VEE4R	

5 Cada par de oligonucleótidos directo e inverso (por ejemplo, Vred2F con Vred2R, VEE2F con VEE2R, etc) se mezcló, se fosforiló, se desnaturalizó y se apareó lentamente. Después, los 3 pares de oligonucleótidos apareados se mezclaron conjuntamente, se unieron entre sí, se digirieron con enzimas *NotI* y *PmeI*, se purificaron en gel usando un kit de extracción en gel QIAquick y se unió al VCR-Chim2-GFP que se había digerido previamente con las mismas enzimas para eliminar la NTR 3' de longitud completa, se había purificado en gel y se había tratado con fosfatasa alcalina de camarón. Los clones positivos para el fragmento se verificaron mediante secuenciación. Esta construcción se denominó VCR-Chim2.2-GFP.

10 Para confirmar la funcionalidad de la configuración de este vector replicón quimérico, el plásmido VCR-Chim2.2-GFP se linealizó con la única enzima de restricción *PmeI* y ARN transcrito *in vitro*. El ARN se cotransfectó junto con ARN auxiliares defectuosos que codifican la cápside y las glucoproteínas del SIN de las construcciones VCR-DH-Sglyd1160 y VCR-DH-Scap también linealizadas con *PmeI*. Las células transfectadas se incubaron a 34 °C durante 24 horas, momento en el cual se recogieron los sobrenadantes del cultivo, se aclararon mediante centrifugación, se diluyeron en serie y se usaron para infectar células BHK-21 sin tratar durante aproximadamente 14 horas. Los títulos de la partículas se determinaron usando análisis de citometría de flujo y fueron similares a VCR-Chim2.2-GFP, demostrando que la reducción del tamaño de la NTR 3' de 117 pb a 37 pb y la sustitución mantiene la funcionalidad del replicón.

15 Similares a los vectores replicón anteriores para su uso como ARN o partículas de replicón, replicones basados en ADN de alfavirus que funcionan directamente en una célula eucariota (por ejemplo, sistemas eucariotas de iniciación de vector en capas) los puede obtener un experto en la materia, usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. Tales replicones basados en ADN se pueden eliminar de diversas secuencias de virus parental, por ejemplo, incluyendo, pero sin limitación, secuencias de la región carboxi-terminal de la nsP3, región de gen de proteína estructural, región de CSE 3' y similares.

Ejemplo 6

25 Uso de diferentes proteínas estructurales para la administración de ARN replicón

Se expresó un antígeno de VIH a partir de ARN replicón del SIN empaquetado con proteínas estructurales bien del SIN o del VEE, y de ARN replicón del VEE empaquetado con proteínas bien del SIN o del VEE de la siguiente manera. Específicamente, un fragmento que contenía la secuencia de gen heteróloga que codifica la p55gag del VIH optimizada con codones (zur Megede, J. *Virology*. 74:2628, 2000) del plásmido pCMV κ m2.GagMod.SF2 se insertó en el vector replicón SINCR (Gardner y col., 2000, *ibid*) en los sitios *XhoI-NotI*, en el vector replicón VCR en los sitios *BbvCI-NotI* y en el vector VCR-Chim2.1 en los sitios *BbvCI-MfeI*. Las construcciones de replicón que codifican la p55gag se denominaron SINCR-p55gag, VCR-p55gag y VCR-Chim2.1-p55gag, respectivamente. Para producir partículas de replicón del SIN del VEE y quiméricas que expresan p55gag, los plásmidos anteriores se linealizaron con la única enzima de restricción *PmeI* y con ARN transcrito *in vitro*. El ARN se cotransfectó junto con ARN auxiliar defectuoso que codifica las proteínas estructurales apropiadas que se transcribieron de los plásmidos linealizados con *PmeI* como se muestra a continuación:

Partículas	Replicón	Cápside	Glucoproteínas
SIN	SINCR-p55gag	SINdI-cap (Polo y col., 1999, <i>ibid</i>)	tDH-V _{UTR} -Sglyd1160
VEE	VCR-p55gag	VCR-DH-Vcap	VCR-DH-VE2-120
SINrep/VEEenv	SINCR-p55gag	tDH-S113Vcap	tDH-V _{UTR} -Sglyd1160
VEErep/SINenv	VCR-Chim2.1p55gag	VCR-DH-Scap	VCR-DH-Vglyd1160

Las células transfectadas se incubaron a 34 °C, los sobrenadantes se recogieron a las 20 horas y a las 36 horas, seguido de aclarado mediante centrifugación y una purificación cromatográfica tal como se describe previamente

(PCT WO 01/92552).

Los títulos de partícula se determinaron mediante tinción intracelular para la expresión de gag en células BHK21 infectadas durante 16 horas con dilución en serie de preparaciones de partículas purificadas. En primer lugar, las células se impermeabilizaron y se fijaron con el kit Cytofix/Cytoperm (Pharmingen), después se tiñeron para p55gag intracelular con anticuerpos conjugados con FITC contra el antígeno del núcleo del VIH-1 (Coulter). El porcentaje de células positivas a gag se determinó usando análisis de citometría de flujo y se usó para calcular los títulos de las partículas.

La inmunogenicidad en modelos de roedor se determinó tras la inmunización con las diferentes preparaciones de partículas de replicón de alfavirus que expresan p55gag del VIH, en dosis de 10^6 o 10^7 UI de partículas de replicón (Figura 12). Se descubrió que cada una era inmunogénica, y se descubrió que una quimera, VEErep/SINenv era un inmunógeno particularmente fuerte.

La demostración de la inmunización secuencial de roedores o primates con partículas de replicón de alfavirus, tales como las partículas de replicón de alfavirus anteriores, que se diferencian por sus proteínas estructurales, se puede realizar usando diversas vías (por ejemplo, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intranasal) y con dosificaciones que varían de 10^3 UI a 10^8 UI o mayores. Por ejemplo, los primates se inmunizaron en primer lugar con 10^7 partículas de SINCR-p55gag que contenían proteínas estructurales del VEE en 0,5 ml de diluyente PBS, mediante una vía subcutánea. Los mismos materiales se administran después una segunda vez 30 días más tarde, mediante la misma vía de inyección. Aproximadamente 6-12 meses más tarde, los animales se inmunizan después una o más veces con 10^7 partículas de SINCR-p55gag que contienen proteínas estructurales del SIN en 0,5 ml de diluyente PBS, mediante una vía intramuscular. La demostración de la inmunogenicidad se realiza usando ensayos convencionales y se puede comparar con animales en paralelo que reciben solo un único tipo de partículas de replicón en el momento de la administración.

Los ejemplos anteriores han descrito diversas técnicas adecuadas para preparar partículas de alfavirus quimérico usando ácidos nucleicos, proteínas no estructurales y proteínas estructurales, así como porciones de los mismos, derivados de dos alfavirus diferentes. Sin embargo, un experto habitual en la materia, usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, podría preparar partículas de alfavirus quimérico de tres o más virus sin excesiva experimentación. Sería lógico combinar las enseñanzas que se encuentran en el presente documento con las enseñanzas de otras divulgaciones técnicas relevantes disponibles de manera general para aquellos expertos en la materia incluyendo, pero sin limitación, patentes, solicitudes de patente, revistas científicas, tratados científicos y referencias convencionales y libros de texto.

Por ejemplo, las partículas de alfavirus quimérico se crean usando vectores replicones del SIN y al menos dos moléculas de ARN auxiliar defectuoso. El ARN replicón codifica proteínas no estructurales del SIN, una señal de empaquetamiento del VEE y un gen heterólogo de interés. El primer ARN auxiliar defectuoso codifica una proteína de la cápside híbrida que tiene un dominio de unión a ARN y un dominio de interacción con glucoproteínas del WEE. El segundo ARN auxiliar defectuoso codifica glucoproteína del WEE. Las partículas de alfavirus quimérico resultante tienen ácido nucleico derivado del SIN con una cápside híbrida VEE/WEE y una glucoproteína de la envoltura del WEE.

En otro ejemplo, se crea una partícula de alfavirus quimérica en la que un replicón del SIN que tiene proteínas no estructurales del SIN y un gen heterólogo de interés se combina con dos moléculas de ARN auxiliar defectuoso. El primer ARN auxiliar defectuoso codifica una cápside híbrida que tiene un dominio de unión a ARN del SIN y un dominio de interacción con glucoproteínas del SFV. El segundo ARN auxiliar defectuoso codifica una glucoproteína híbrida que tiene una cola citoplasmática del SFV con el resto de la envoltura de glucoproteína proporcionada por el VEE. La partícula de alfavirus quimérica tiene ácidos nucleicos del SIN con un gen heterólogo de interés encapsulado en una cápside híbrida de SIN/SFV con una glucoproteína de la envoltura híbrida de SFV/VEE, procediendo la porción de ectodominio más externa de la glucoproteína del VEE.

En otro ejemplo más, se usaron cuatro alfavirus diferentes para preparar la partícula de alfavirus quimérico. En este ejemplo, se proporciona un ARN replicón del SIN que codifica proteínas no estructurales del SIN, una señal de empaquetamiento del VEE y un gen heterólogo de interés. Un primer ARN auxiliar defectuoso codifica una cápside híbrida que tiene un dominio de unión a ARN del VEE y un dominio de interacción con glucoproteínas del WEE. El segundo ARN auxiliar defectuoso codifica una glucoproteína híbrida que tiene una cola citoplasmática del WEE siendo el resto de glucoproteína proporcionada por el SFV. La partícula de alfavirus quimérica resultante tiene ARN del SIN y un gen heterólogo de interés, una cápside híbrida de VEE/WEE y una glucoproteína híbrida de WEE/SFV, siendo la porción de ectodominio más externa de la glucoproteína derivada del SFV.

Muchas otras combinaciones son posibles y los ejemplos anteriores sirven para ilustrar la tremenda versatilidad de la presente divulgación.

Ejemplo 7

Uso de vectores replicones de alfavirus y auxiliares defectuosos con diferentes elementos de control

Para producir partículas de replicón de alfavirus usando componentes de vector (por ejemplo, ARN replicón, sistema eucariota de iniciación de vector en capas) y de empaquetamiento (por ejemplo auxiliar defectuoso, casete de expresión de proteína estructural) con diferentes elementos de control, se puede utilizar una amplia variedad de combinaciones. Por ejemplo, se puede construir un replicón basado en ADN del plásmido del SIN (sistema eucariota de iniciación de vector en capas) que contiene una secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural (CSE 3') diferente de la contenida en los casetes de expresión de proteína estructural de una línea celular de empaquetamiento. Más específicamente, la modificación del extremo 3' del SIN para incorporar una señal de poliadenilación derivada del gen de hormona de crecimiento bovino se realiza tal como se describe a continuación. La secuencia resultante:

5
10
GCGGCCGCGCTACGCCCAATGATCCGACCAGCAAAACTCGATGTACTTCCG
AGGAACTGATGTGCATAATGCATCAGGCTGGTACATTAGATCCCCGCTTACCG
CGGGCAATATAGCAACACTAAAACTCGATGTACTTCCGAGGAAGCGCAGTG
CATAATGCTGCGCAGTGTTGCCACATAACCACTATATTAACCATTTATCTAGC
GGACGCCAAAAACTCAATGTATTTCTGAGGAAGCGTGGTGCATAATGCCACG
CAGCGTCTGCATAACTTTTATTATTTCTTTTATTAATCAAATAAATTTGTTTT
AACATTTCAAAAAAAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGG
GTTAAAC (SEQ ID NO 56)

por lo tanto, se diseña por ingeniería genética en la construcción del plásmido del SIN. Esta nueva secuencia se sustituye por el extremo 3' existente, el tramo poli(A) sintético, la ribozima y el sitio BHGpolyA del plásmido pSINCP (véase, el documento WO 01/81690) de la siguiente manera. El plásmido pSINCP-bgal (pSINCP que expresa bgal) se elimina de los elementos anteriormente mencionados mediante PCR con los siguientes cebadores:

15
 5'ACAGACAGACCGCGGCCGCACAGACAGACGTTTAAACGTGGGCGAAGAACT
 CCAGCATGAGATCC (SEQ ID NO 57)

que contiene un sitio *NotI* (12-19 nts.), un sitio *PmeI* (30-37 nt) y 38-65 nts que son complementarios a secuencias de SINCP-bgal aguas abajo de los elementos anteriormente mencionados, un sitio *NotI* que los precede.

NPSrev:

5'-TTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGAC (SEQ ID NO 58)

20
25
 que es complementaria a la región de la estructura principal del plásmido que contiene el sitio *SphI*. el fragmento de 492 pb amplificado se purifica a partir de gel de agarosa usando el kit de extracción en gel QIAquick, se digiere con *NotI* y *SphI* y se une a SINCP-bgal que también se ha digerido con *NotI* y *SphI* para eliminar la secuencia existente (1106 pb). Los clones que contienen el fragmento recién generado se verifican mediante secuenciación y la construcción intermedia se denomina SINCPt-bgal. El nuevo extremo 3' se genera después usando oligonucleótidos de solapamiento:

SINpA1F	5'-tcgaccggcgccgcccgcgctacgcccccaatgatccgaccagcaaaactcgatgtactccgaggaactg-3' (SEQ ID NO 59)
SINpA1R	5'-ggtcggatcattggggcgtagcggcggcggcccggtcga-3' (SEQ ID NO 60)
SINpA2F	5'-atgtgcataatgcatcaggcgtgacattagatccccgctaccggggcaatagcaacactaaaaac-3' (SEQ ID NO 61)
SINpA2R	5'-agcgggatctaattgaccagcctgatgcattatgcacatcagttcctcggaagtacatcgagtttgct-3' (SEQ ID NO 62)
SINpA3F	5'-tcgatgtactccgaggaagcgcagtgacataatgctgagcagtggtccacataaccactatattaacca-3' (SEQ ID NO 63)
SINpA3R	5'-gcgcagcattatgcactgctcctcctcggaagtacatcgagttttagttgctatattgccgcggtga-3' (SEQ ID NO 64)
SINpA4F	5'-ttatctagcggagcgcacaaaactcaatgtattctgaggaagcgtggtgcataatgccacgcagcgtct-3' (SEQ ID NO 65)
SINpA4R	5'-cctcagaatacattgagttttggcgtccgctagataaatggttaatatagttggtatggtgcaacact-3' (SEQ ID NO 66)
SINpA5F	5'-gcataactttattattcttttattaatcaataaaatgttttttaacattcaaaaaaaagtaggtg-3' (SEQ ID NO 67)
SINpA5R	5'-aacaaaatttttgattaataaaagaataataaaagtatgcagacgctgctggtgacattatgccacagcctt-3' (SEQ ID NO 68)
SINpA6F	5'-tcattctattcggggggtgggggtgggggttaaacatcatgatcg-3' (SEQ ID NO 69)
SINpA6R	5'-cgatcatgatgttaaacccccacccccacccccagaaatagaatgacacctactttttttgaaatgtaaa-3' (SEQ ID NO 70)

Los oligonucleótidos se mezclan, se fosforilan, se desnaturalizan, se alinean lentamente y se unen. Tras desactivar la ligasa, el ADN se digiere con las enzimas *NotI* y *PmeI*, se purifica en gel usando el kit de

extracción en gel QIAquick y se une a SINCPt-bgal digerido con las mismas enzimas y tratado con fosfatasa alcalina. Los clones que contienen el fragmento recién generado se verifican mediante secuenciación y la construcción final se denomina SINCP-pA-bgal.

5 Para producir partículas de replicón se transfecta este plásmido en una línea celular de empaquetamiento del SIN que contiene casetes de expresión de proteína estructural, que no tienen secuencias del extremo 3' modificadas de manera similar (Polo y col., 1999. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU, 96:4598-603). Tras la incubación apropiada, las partículas de replicón se recogieron y se purificaron tal como se describe anteriormente.

10 La relación de los intervalos de los valores del presente documento pretende simplemente servir como un procedimiento de referencia abreviado de manera individual para cada valor distinto que esté dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se relacionase de manera individual en el presente documento. Todos los procedimientos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa en el presente documento o se contradiga otra cosa claramente en el contexto. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos o el lenguaje ejemplar (por ejemplo "tal como") proporcionado en el presente documento pretende simplemente ilustrar mejor la invención y no supone una limitación en el ámbito de las reivindicaciones. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como indicativo de cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

15 Los agrupamientos de elementos alternativos o realizaciones de la invención desvelados en el presente documento no se deben interpretar como limitaciones. Cada miembro del grupo se puede referenciar y reivindicar de manera individual o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos que se encuentran en el presente documento. Se espera que uno o más miembros de un grupo puedan incluirse en, o eliminarse de, un grupo, por razones de conveniencia y/o patentabilidad. Cuando se produce dicha inclusión o eliminación, se considera que la memoria descriptiva del presente documento contiene el grupo tal como se ha modificado cumpliendo así con la descripción escrita de todos los grupos Markush utilizados en las reivindicaciones adjuntas.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CHIRON CORPORATION

<120> PARTÍCULAS DE REPLICÓN DE ALFAVIRUS QUIMÉRICO

<130> P054844EP

30 <150> US 60/295,451

<151> 2001-05-31

<160> 92

<170> PatentIn Ver. 2,0

<210> 1

<211> 39

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador 5' del VEE

<400> 1

40 aagcagagct cgttagtga accgtatggg cggcgcacg 39

<210> 2

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador 3' del VEE

<400> 2

gacctgcgtc cagctcatct cgatctgtcc ggatcttccg c 41

<210> 3

50 <211> 80

<212> ADN

ES 2 624 854 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: PL1F

<400> 3

```
cacgcgtact actgtaact catcaagatc tactaggcct aaggcaccac ctgcaggtag 60
tagatacaca tcataatacc 80
```

5

<210> 4

<211> 78

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: PL2F

<400> 4

```
tagggcgcg atttaaatga tttagactac gtcagcagcc ctgagcgcg cgcccacca 60
gcggccgcag gatagttt 78
```

15

<210> 5

<211> 79

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: PL1R

20

<400> 5

```
tatgatgtgt atctactacc tgcaggtggt gccttaggcc tagtagatct tgatgagtta 60
acagtagtac gcgtggcc 79
```

25

<210> 6

<211> 83

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: PL2R

<400> 6

```
aaactatcct gcggccgctg ggtgggcgcg ccgctgaggg ctgctgacgt agtctaaatc 60
atttaaatcg ccgccctagg tat 83
```

30

<210> 7

<211> 58

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Descripción de secuencia artificial: VEE3=-1F

<400> 7

```
ggccgcatc agcagcaatt ggcaagctgc ttacatagaa ctgcggcga ttggcatg 58
```

40

<210> 8

<211> 50

<212> ADN

ES 2 624 854 T3

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: VEE3'-1R
<400> 8
5 ccaatgccg cgagttctat gtaagcagct tgccaattgc tgctgtatgc 50
<210> 9
<211> 61
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: VEE3'-2F
<400> 9
 ccgccttaaa atttttattt tattttttct tttcttttcc gaatcggatt ttgtttttaa 60
 t 61
15 <210> 10
<211> 65
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: VEE3'-2R
20 <400> 10
 attaaaaaca aaatccgatt cggaaaagaa aagaaaaaat aaaataaaaa tttaaggcg 60
 gcatg 65
25 <210> 11
<211> 75
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: VEE3'-3F
<400> 11
 atttcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaagggtc ggcattggcat 60
 ctccacctcc tcgcg 75
30 <210> 12
<211> 78
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
35 <223> Descripción de secuencia artificial: VEE3'-3R
<400> 12
 gaccgcgagg aggtggagat gccatgccga cccttttttt tttttttttt tttttttttt 60
 tttttttttt tttgaaat 78
40 <210> 13
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: VEE3'-4F

<400> 13

```
gtccgacctg ggcattccgaa ggaggacgca cgtccactcg gatggctaag ggagagccac 60
gttt 64
```

5

<210> 14

<211> 61

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: VEE3'-4R

<400> 14

```
aaacgtggct ctcccttagc catccgagtg gacgtgcgtc ctcttcgga tgcccaggtc 60
g 61
```

15

<210> 15

<211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: VGBbvCI

<400> 15

20 atatatact cgagcctcag catgtcacta gtgaccacca tgt 43

<210> 1

<211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: VGNcoIR

<400> 16

atatataaat tccatgggta tggagtcc 28

30

<210> 17

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: TRDCtR

35

<400> 17

atatatatgc ggccgcttac cattgctcgc agttctccg 39

<210> 18

<211> 44

<212> ADN

40

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: TRDCtF

<400> 18

gagatgcat cgggcacgca tgtgtggtcg gagggaagtt attc

45

<210> 19

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: SINNTF
 <400> 19
 5 atatatctcg agccacatg aatagaggat tcttaacat g 41
 <210> 20
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: S113R
 <400> 20
 10 gggaactgt tgctgcctc caactaagt g 31
 <210> 21
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: SINNTR
 <400> 21
 20 gaataactc cctccacca cacatgctg cccgatgaca tctc
 <210> 22
 <211> 34
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: S127R
 <400> 22
 ccacacaagc gtaccgatg acatctcgt ctc 34
 <210> 23
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: S116R
 <400> 23
 35 catgattggg aacaatctgt cggcctcaa c 31
 <210> 24
 <211> 27
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: S109R
 <400> 24
 45 gtcagactcc aactaagtg ccatgcg 27
 <210> 25
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: SINcF
 <400> 25
 gggaagataa acggctacgc tctggccatg gaaggaaagg 40
 5
 <210> 26
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: SINcR
 10
 <400> 26
 atatatatgc ggccgctcac cactcttctg tccttc 37
 <210> 27
 <211> 31
 <212> ADN
 15
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: TRD125F
 <400> 27
 gccgacaaga cgtccaat catgttgaa g 31
 20
 <210> 28
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: TRDCtR
 25
 <400> 28
 atatatatgc ggccgcttac cattgctgc agttctccg 39
 <210> 29
 <211> 44
 <212> ADN
 30
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: TRDCtF
 <400> 29
 gagatgcat cgggcacgca tgtgtgctg gaggaagtt attc
 35
 <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: TRD139F
 <400> 30
 tcatcggga cgctgtgtg gtcg 24
 <210> 31
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: TRD128F
 <400> 31

gacagattgt tccaatcat gttggaaggg 30

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

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: TRD121F

<400> 32
 acttaagttg gagtctgaca agacgttccc aatc 34

10 <210> 33
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> Descripción de secuencia artificial: TRDNtF

<400> 33
 atatatctcg agccaccatg ttcccggtcc agccaatg 38

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

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: TRDNtR

<400> 34
 25 cctttccttc catggccaga gcgtagccgt ttatcttccc 40

<210> 35
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: VE2F

<400> 35
 atatatcagg ggactccatc accatgg 27

<210> 36
 <211> 77
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: VSGE2R

<400> 36
 40 **gggattacgg cgtttggggc cagggcgtat ggcgtcaggc actcacggcg cgctttgcaa 60**
aacagccagg tagacgc 77

<210> 37
 <211> 84
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: VSGE3F

<400> 37

ES 2 624 854 T3

gccccaaacg ccgtaatccc aacttcgctg gcactottgt gctgcttag gtcggccaat 60
gctgagacca cctgggagtc cttg 84

<210> 38

<211> 50

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: VEE3'-1R

<400> 38

ccaatgccg cgagttctat gtaagcagct tgccaattgc tgctgatgc 50

10 <210> 39

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: M1R

<400> 39

gtatggcgtc aggcacgcac ggcgcgcttt g 31

<210> 40

<211> 31

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: M1F

<400> 40

25 agcgcgccgt gctgcctga cgccatacgc c 31

<210> 41

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: M2R

<400> 41

atggcgtcag gcactcaacg cgcgctttgc aaaac 35

35 <210> 42

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: M2F

40 <400> 42

ttgcaaagc gcgcgttgag tgctgacgc catac 35

<210> 43

<211> 35

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: M3R

<400> 43
atggcgtag gcacgcaacg cgcgcttgc aaaac 35

5 <210> 44
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: M3F

10 <400> 44
ttgcaaagc gcggttgcg tgctgacgc catac 35

<210> 45
<211> 21
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: ScAatIIF

<400> 45
gccgacagat cgttcgacgt c 21

20 <210> 46
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Descripción de secuencia artificial: ScVg1R

<400> 46
atatatatgg tcactagtga ccactcttct gtccttcg 40

<210> 47
<211> 40
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: VglyR

<400> 47
35 atatatatgc ggccgctcaa ttatgttct ggttgtagc 40

<210> 48
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: VglyF

<400> 48
atatatctcg agccgccagc catgtcacta gtagccac 38

<210> 49
45 <211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: 5' Pr

50 <400> 49

ES 2 624 854 T3

atatctcgag agggatcacg ggagaaac 28

<210> 50

<211> 28

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: 3' Pr

<400> 50

agaggagctc aaataccacc ggccctac 28

10 <210> 51

<211> 705

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: oligo 1 del fragmento de nsP del VEE

<400> 51

```

ctagagttaa cggctcgtaa cataggccta tgcagctctg acgttatgga gcggtcacgt 60
agagggatgt ccattcttag aaagaagtat ttgaaaccat ccaacaatgt tctattctct 120
gttggctcga ccatctacca cgagaagagg gacttactga ggagctggca cctgccgtct 180
gtatttcact tacgtggcaa gcaaaattac acatgtcggg gtgagactat agttagttgc 240
gacgggtacg tcgttaaaag aatagctatc agtccaggcc tgtatgggaa gccttcaggc 300
tatgctgcta cgatgcaccg cgagggattc ttgtgctgca aagtgcacaga cacattgaac 360
ggggagaggg tctcttttcc cgtgtgcacg tatgtgccag ctacattgtg tgaccaaatg 420
actggcatic tggcaacaga tgtcagtgcg gacgacgcgc aaaaactgct ggttgggctc 480
aaccagcgtg tagtcgtcaa cggtcgcacc cagagaaaca ccaataccat gaaaaattac 540
cttttgcccg tagtgccca ggcatttgct aggtgggcaa aggaatataa ggaagatcaa 600
gaagatgaaa ggccactagg actacgagat agacagttag tcatgggggtg ttgttgggct 660
tttagaaggc acaagataac atctatttat aagcgcccg ataca 705

```

<210> 52

<211> 705

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: oligo 2 del fragmento de nsP del VEE

<400> 52

```

tcaattgccg agcattgtat ccggatacgt cgagactgca atacctcgcc agtgcattctc 60
cctacaggta agaatcttcc ttcataaaact ttggtagggt gttacaagat aagagacaac 120
cgagctggta gatggtgctc ttctccctga atgactcctc gaccgtggac ggcagacata 180
aagtgaatgc accgttcggt ttaatgtgta cagccacact ctgatatcaa tcaacgctgc 240
ccatgcagca atttcttat cgatagtcag gtccggacat acccttcgga agtccgatac 300
gacgatgcta cgtggcgctc cctaagaaca cgacgtttca ctgtctgtgt aacttgcccc 360
tctcccagag aaaagggcac acgtgcatac acggtcgatg taacacactg gtttactgac 420
cgtatgaccg ttgtctacag tcacgcctgc tgcgcgtttt tgacgaccaa cccgagttgg 480
tcgcatatca gcagttgccg gcgtgggtct ctttgtgggt atggtacttt ttaatggaaa 540
acgggcatca ccgggtccgt aaacgatcca cccgtttcct tatattcctt ctagttcttc 600
tactttccgg tgatcctgat gctctatctg tcaatcagta cccacaaca acccgaaaat 660
cttccgtggt ctattgtaga taaatattcg cgggcctatg tgcgc 705

```

25 <210> 53

<211> 63

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: aminoácido del SINDC

ES 2 624 854 T3

<400> 53

Lys Gln Ala Pro Lys Gln Pro Pro Lys Pro Lys Lys Pro Lys Thr Gln
 1 5 10 15
 Glu Lys Lys Lys Lys Gln Pro Ala Lys Pro Lys Pro Gly Lys Arg Gln
 20 25 30
 Arg Met Ala Leu Lys Leu Glu Ala Asp Arg Ser Phe Asp Val Lys Asn
 35 40 45
 Glu Asp Gly Asp Val Ile Gly His Ala Leu Ala Met Glu Gly Lys
 50 55 60

<210> 54

<211> 63

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: aminoácido del HR del SIN

<400> 54

Lys Gln Ala Pro Lys Gln Pro Pro Lys Pro Lys Lys Pro Lys Thr Gln
 1 5 10 15
 Glu Lys Lys Lys Lys Gln Pro Ala Lys Pro Lys Pro Gly Lys Arg Gln
 20 25 30
 Arg Met Ala Leu Lys Leu Glu Ala Asp Arg Leu Phe Asp Val Lys Asn
 35 40 45
 Glu Asp Gly Asp Val Ile Gly His Ala Leu Ala Met Glu Gly Lys
 50 55 60

<210> 55

<211> 76

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: aminoácido del TRD

<400> 55

Ser Gln Lys Gln Lys Gly Gly Gly Gln Gly Lys Lys Lys Lys Asn Gln
 1 5 10 15
 Gly Lys Lys Lys Ala Lys Thr Gly Pro Pro Asn Pro Lys Ala Gln Asn
 20 25 30
 Gly Asn Lys Lys Lys Thr Asn Lys Lys Pro Gly Lys Arg Gln Arg Met
 35 40 45
 Val Met Lys Leu Glu Ser Asp Lys Thr Phe Pro Ile Met Leu Glu Gly
 50 55 60
 Lys Ile Asn Gly Tyr Ala Cys Val Val Gly Gly Lys
 65 70 75

<210> 56

<211> 77

ES 2 624 854 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: aminoácido 6119

5 <400> 56

Ala Pro Gln Lys Gln Lys Gly Gly Gly Gln Gly Lys Lys Lys Lys Asn
 1 5 10 15
 Gln Gly Lys Lys Lys Ala Lys Thr Gly Pro Pro Asn Pro Lys Ala Gln
 20 25 30
 Ser Gly Asn Lys Lys Lys Pro Asn Lys Lys Pro Gly Lys Arg Gln Arg
 35 40 45
 Met Val Met Lys Leu Glu Ser Asp Lys Thr Phe Pro Ile Met Leu Glu
 50 55 60
 Gly Lys Ile Asn Gly Tyr Ala Cys Val Val Gly Gly Lys
 65 70 75

<210> 57
 <211> 76
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: aminoácido de MAC10

<400> 57

Pro Gln Lys Pro Lys Arg Gly Ser Gln Gly Lys Arg Lys Lys Asn Gln
 1 5 10 15
 Gly Lys Lys Lys Ala Lys Thr Gly Pro Pro Asn Gln Lys Ala Gln Asn
 20 25 30
 Gly Asn Lys Lys Lys Thr Asn Lys Lys Pro Gly Lys Arg Gln Arg Met
 35 40 45
 Val Met Lys Leu Glu Ser Asp Lys Thr Phe Pro Ile Met Leu Glu Gly
 50 55 60
 Lys Ile Asn Gly Tyr Ala Cys Val Val Gly Gly Lys
 65 70 75

15 <210> 58
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Dominio de unión a ARN consenso

<400> 58

ES 2 624 854 T3

Gln Lys Pro Lys Gly Gln Gly Lys Lys Lys Lys Asn Gln Gly Lys Lys
 1 5 10 15
 Lys Ala Lys Thr Gly Pro Pro Asn Lys Ala Gln Gly Asn Lys Lys Lys
 20 25 30
 Asn Lys Lys Pro Gly Lys Arg Gln Arg Met Val Met Lys Leu Glu Ser
 35 40 45
 Asp Lys Thr Phe Pro Ile Met Leu Glu Gly Lys Ile Asn Gly Tyr Ala
 50 55 60
 Cys Val Val Gly Gly Lys
 65 70

<210> 59
 <211> 36
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Glucoproteína E2 de SINDCE2t
 <400> 59

Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys Cys Val Arg
 20 25 30
 Ser Ala Asn Ala
 35

10 <210> 60
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de secuencia artificial: Glucoproteína E2 de SINHRE2t
 <400> 60

Cys Ala Cys Lys Ala Arg Arg Glu Cys Leu Thr Pro Tyr Ala Leu Ala
 1 5 10 15
 Pro Asn Ala Val Ile Pro Thr Ser Leu Ala Leu Leu Cys Cys Val Arg
 20 25 30
 Ser Ala Asn Ala
 35

20 <210> 61
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Glucoproteína E2 de TRDE2t
 <400> 61

ES 2 624 854 T3

Leu Phe Cys Arg Ser Arg Val Ala Cys Leu Thr Pro Tyr Arg Leu Thr
 1 5 10 15
 Pro Asn Ala Arg Ile Pro Phe Cys Leu Ala Val Leu Cys Cys Ala Arg
 20 25 30
 Thr Ala Arg Ala
 35

5 <210> 62
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Glucoproteína E2 de 6119E2t
 <400> 62

Leu Phe Cys Lys Ser Arg Val Ser Cys Leu Thr Pro Tyr Arg Leu Thr
 1 5 10 15
 Pro Asn Ala Arg Met Pro Phe Cys Leu Ala Val Leu Cys Cys Ala Arg
 20 25 30
 Thr Ala Arg Ala
 35

10 <210> 63
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de secuencia artificial: Glucoproteína E2 de MAC10E2t
 <400> 63

Leu Phe Cys Lys Ser Arg Val Ser Cys Leu Thr Pro Tyr Gln Leu Thr
 1 5 10 15
 Pro Asn Ala Arg Met Pro Phe Cys Leu Ala Val Phe Cys Cys Ala Arg
 20 25 30
 Thr Ala Arg Ala
 35

20 <210> 64
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Glucoproteína E2 consenso
 <400> 64

ES 2 624 854 T3

Leu Phe Cys Lys Ser Arg Val Ser Cys Leu Thr Pro Tyr Leu Thr Pro
 1 5 10 15

Asn Ala Arg Ile Pro Cys Leu Ala Val Leu Cys Cys Ala Arg Thr Ala
 20 25 30

Arg Ala

5 <210> 65
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Chimera-1A
 <400> 65

```
tggccatgac caccctggcc tcctccgtga agagcttttc ctatcttcgc ggcgcgcca 60
tcaccttgta tggataaggg atcacgggag aaaccgtggg atacgcggtt acacacaata 120
gcgagggctt cttgctatgc aaagttactg acacagtaaa aggagaacgg gtatcgttcc 180
ctgtgtgcac gtacatcccg gccaccatac catgactact ctagctagca gtgttaaatc 240
attcagctac ctgagagggg cccctataac tctctacggc taacctgaat ggactacgac 300
atagtctagt ccgccaagcc tcagcgg 327
```

10 <210> 66
 <211> 331
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Complemento de Chimera-1A
 <400> 66

```
accggtactg gtgggaccgg aggaggcact tctcgaaaag gatagaagcg ccgcgcgggt 60
agtggaacat acctattccc tagtgcctc tttggcacc tatgcgcaa tgtgtgttat 120
cgctcccga gaacgatagc tttcaatgac tgtgtcattt tcctcttgcc catagcaagg 180
gacacacgtg catgtagggc cggtggtatg gactgatga gatcgatcg cacaatttag 240
taagtcgatg gactctcccc ggggatattg agagatgccg attggactta cctgatgctg 300
tatcagatca ggcggttcgg agtcgcccgc c 331
```

20 <210> 67
 <211> 346
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Chimera 1B
 <400> 67

```
tggccatgac caccctggcc tcctccgtga agagcttttc ctatcttcgc ggcgcgcca 60
tcaccttgta tggataaggg atcacgggag aaaccgtggg atacgcggtt acacacaata 120
gcgagggctt cttgctatgc aaagttactg acacagtaaa aggagaacgg gtatcgttcc 180
ctgtgtgcac gtacatcccg gccaccataa cttccatcat agttatggcc atgactactc 240
tagctagcag tgttaaatca ttcagctacc tgagaggggc ccctataact ctctacggct 300
aacctgaatg gactacgaca tagtctagtc ccgccaagcct cagcgg 346
```

25 <210> 68
 <211> 132

ES 2 624 854 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Chimera 2 de empaquetamiento de SIN/VEE

5 <400> 68

```

gggatcacgg gagaaaccgt gggatacgcg gttacacaca atagcgaggg cttcttgcta 60
tgcaaagtta ctgacacagt aaaaggagaa cgggtatcgt tcctgtgtg cacgtacatc 120
ccggccacca ta 132
  
```

<210> 69
 <211> 60
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: SINCR-AR339

<400> 69
 aggaggacug aauacugacu aaccggggua ggugguaca uauuuucgac ggacacaggc 60

15 <210> 70
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: SINCR-AR339

20 <220>
 <221> SITIO
 <222> (6)
 <223> Xaa = SIN p.s. sitio de inserción

25 <400> 70

```

      Arg Arg Thr Glu Tyr Xaa Leu Thr Gly Val Gly Gly Tyr Ile Phe Ser
      1           5           10           15
      Thr Asp Thr Gly
      20
  
```

<210> 71
 <211> 60
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: SIN AR86

<400> 71
 aggaggaccg aauacugucu aaccggggua ggugguaca uauuuucgac ggacacaggc 60

35 <210> 72
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: aminoácido del AR86 del SIN

40 <400> 72

ES 2 624 854 T3

Arg Arg Thr Glu Tyr Cys Leu Thr Gly Val Gly Gly Tyr Ile Phe Ser
 1 5 10 15

Thr Asp Thr Gly
 20

5 <210> 73
 <211> 60
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: AURA
 <400> 73
 ggaaacagac aauauugacu aaccggggua gguggguaca uauucucuuc ugauacaggc 60

10 <210> 74
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Aminoácido de AURA

<220>
 <221> SITIO
 <222> (6)
 <223> Xaa = SIN p.s. sitio de inserción

20 <400> 74

Gly Asn Arg Gln Tyr Xaa Leu Thr Gly Val Gly Gly Tyr Ile Phe Ser
 1 5 10 15

Ser Asp Thr Gly
 20

25 <210> 75
 <211> 60
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: WEE
 <400> 75
 cgucaacauu ccaacugacg guaugaagcg ggagcguaua uuuucucauc ggaaacaggc 60

30 <210> 76
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Aminoácido de AURA

<220>
 <221> SITIO
 <222> (6)
 <223> Xaa = SIN p.s. sitio de inserción

40 <400> 76

ES 2 624 854 T3

Arg Gln His Ser Asn Xaa Arg Tyr Glu Ala Gly Ala Tyr Ile Phe Ser
 1 5 10 15

Ser Glu Thr Gly
 20

5 <210> 77
 <211> 60
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: EEE
 <400> 77
 cggaggcacu cgaaugacg guacgaagcg ggcgcguaca uuuucucauc cgagacggga 60

10 <210> 78
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Aminoácido de EEE

<220>
 <221> SITIO
 <222> (6)
 <223> Xaa = SIN p.s. sitio de inserción

20 <400> 78

Arg Arg His Ser Asn Xaa Arg Tyr Glu Ala Gly Ala Tyr Ile Phe Ser
 1 5 10 15

Ser Glu Thr Gly
 20

25 <210> 79
 <211> 60
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: VEE
 <400> 79
 guagcacaac aacaugacg guuugaugcg ggugcauaca uuuuuuccuc cgacaccggu 60

30 <210> 80
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Aminoácido de VEE

<220>
 <221> SITIO
 <222> (6)
 <223> Xaa = SIN p.s. sitio de inserción

40 <400> 80

ES 2 624 854 T3

Val Ala Gln Gln Gln Xaa Arg Phe Asp Ala Gly Ala Tyr Ile Phe Ser
 1 5 10 15

Ser Asp Thr Gly
 20

5 <210> 81
 <211> 60
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: MID
 <400> 81
 cguuuuacgu cagcaugacu agaccgggcg ggggccuaca uauucucauc ggauacaggc 60

10 <210> 82
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Aminoácido MID

<220>
 <221> SITIO
 <222> (6)
 <223> Xaa = SIN p.s. sitio de inserción

20 <400> 82

Arg Leu Thr Ser Ala Xaa Leu Asp Arg Ala Gly Ala Tyr Ile Phe Ser
 1 5 10 15

Ser Asp Thr Gly
 20

25 <210> 83
 <211> 60
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: RR
 <400> 83
 gauuuugacc aauucugacu agggacagcg ggggcuaca ucuucucguc ugauaccgga 60

30 <210> 84
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Aminoácido RR

<220>
 <221> SITIO
 <222> (6)
 <223> Xaa = SIN p.s. sitio de inserción

40 <400> 84

Asp Phe Asp Gln Phe Xaa Leu Gly Arg Ala Gly Ala Tyr Ile Phe Ser
 1 5 10 15

Ser Asp Thr Gly
 20

<210> 85

ES 2 624 854 T3

<211> 60
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: SF

<400> 85
 uucgacgacg uccugcgacu aggccgcgcg ggugcauaua uuuuccuccuc ggacacuggc 60

10
 <210> 86
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Aminoácido SF

<400> 86

Phe Asp Asp Val Leu Arg Leu Gly Arg Ala Gly Ala Tyr Ile Phe Ser
 1 5 10 15

15
 Ser Asp Thr Gly
 20

<210> 87
 <211> 60
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ONN

<400> 87
 acagacgaag aguuacgacu agacagagca ggggguuaca uauuccuccuc ugacacuggu 60

25
 <210> 88
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Aminoácido ONN

30
 <400> 88

Thr Asp Glu Glu Leu Arg Leu Asp Arg Ala Gly Gly Tyr Ile Phe Ser
 1 5 10 15

Ser Asp Thr Gly
 20

<210> 89
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador 5' de PCR para nsp3

<400> 89
 acggccagtg aattgtaata cgactca 27

40
 <210> 90
 <211> 170
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 624 854 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Cebadores de sitio de empaquetamiento del Sindbis

<400> 90

```
gttcgtagca caacaacaag ggatcacggg agaaaccgtg ggatacgcgg ttacacacaa 60
tagcgagggc ttcttgctat gcaaagtac tgacacagta aaaggagaac gggtatcggt 120
ccctgtgtgc acgtacatcc cggccacat atgacggttt gatgcgggtg 170
```

5

<210> 91

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Cebador 3' de PCR para nsp4

<400> 91

ctagtggatc cgagctcggg acc 23

<210> 92

<211> 10

15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Empaquetamiento de Sindbis. Señal

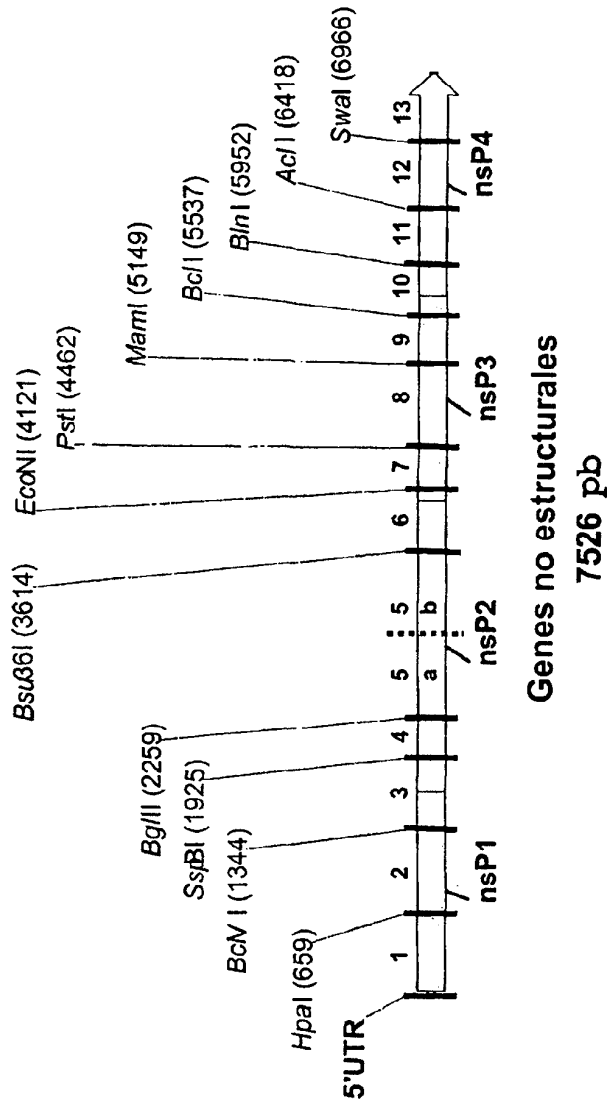
<400> 92

20

tgacggttg 10

REIVINDICACIONES

1. Un ARN replicón de alfavirus que comprende una secuencia 5' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural, secuencias que codifican proteínas no estructurales de alfavirus biológicamente activas, un promotor subgenómico de alfavirus, una secuencia heteróloga que no es de alfavirus, y una secuencia 3' requerida para la amplificación mediada por proteína no estructural, en la que la secuencia que codifica al menos una de dichas proteínas no estructurales deriva del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) y en la que la secuencia de dicho ARN del replicón presenta entre el 33,33 % y el 66,67 % de identidad de secuencia con el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) en toda la longitud del genoma del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) y
- 5
- 10 en el que el ARN replicón de alfavirus comprende secuencias derivadas del virus Sindbis (SIN), en el que las secuencias derivadas de SIN comprenden una señal de empaquetamiento insertada en un sitio seleccionado de la unión de nsP3 con nsP4, después de la fase abierta de lectura de nsP4, y una delección en un gen de proteína no estructural.
2. El ARN replicón de alfavirus de la reivindicación 1, en el que el replicón presenta entre el 40 % y el 66,67 %, entre el 50 % y el 66,67 %, entre el 55 % y el 66,67 % o entre el 60 % y el 66,67 % de identidad de secuencia con el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE).
- 15
3. El ARN replicón de alfavirus de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la secuencia heteróloga que no es de alfavirus codifica un agente terapéutico o un inmunógeno.
4. Un procedimiento de producción de partículas de replicón alfavíricas que comprende la introducción de ARN replicón de alfavirus de cualquier reivindicación precedente y un ARN auxiliar defectuoso que es capaz de amplificarse y de expresar una o más proteínas estructurales de alfavirus en una célula hospedadora en condiciones que permitan la formación de las partículas.
- 20
5. Una partícula de replicón de alfavirus que comprende el ARN replicón de alfavirus de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 25
6. Un sistema eucariota de iniciación de vector en capas, que comprende un promotor 5' que es capaz de iniciar en una célula eucariota la síntesis de ARN a partir de ADNc, y una secuencia de vector de ácido nucleico que es capaz de dirigir su propia replicación y expresar una secuencia heteróloga, en la que dicha secuencia de vector de ácido nucleico es una copia de ADNc del replicón de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.



Fragmentos n.º 1-13 de la síntesis de genes

FIGURA 1

FIGURA 2**FRAGMENTO N.º 2 DE VEE (Hpa[659] – BciVI[1344]; ΔNSP1)**

656 VEE 2-1
 CTAGAGTTA ACGGCTCGTA ACATAGGCCT ATGCAGCTCT GACGTTATGG
 TCAAT TGCCGAGCAT TGTATCCGGA TAGGTCGAGA CTGCAATACC
VEE 2-26 VEE 2-25

706 VEE 2-2
 AGCGGTCACG TAGAGGGATG TCATTCTTA GAAAGAAGTA TTTGAAACCA
 TCGCCAGTGC ATCTCCCTAC AGGTAAGAAT CTTCTTCAT AAACTTTGGT
VEE 2-24

756 VEE 2-3
 TCCAACAATG TTCTATTCTC TGTGGGCTCG ACCATCTACC ACGAGAAGAG
 AGGTTGTTAC AAGATAAGAG ACAACCGAGC TGGTAGATGG TGCTCTTCTC
VEE 2-23

806 VEE 2-4
 GGACTIONTCTG AGGAGCTGGC ACCTGCCGTC TGTATTTTAC TTACGTGGCA
 CCTGAATGAC TCCTCGACCG TGGACGGCAG ACATAAAGTG AATGCACCGT

856 VEE 2-5
 AGCAAAATTA CACATGTCGG TGTGAGACTA TAGTTAGTTG CGACGGGTAC
 TCGTTTTAAT GTGTACAGCC AACTCTGAT ATCAATCAAC GCTGCCCATG
VEE 2-22

906 VEE 2-21
 GTCGTTAAAA GAATAGCTAT CAGTCCAGGC CTGTATGGGA AGCCTTCAGG
 CAGCAATTTT CTTATCGATA GTCAGGTCCG GACATACCCT TCGGAAGTCC

956 VEE 2-6
 CTATGCTGCT ACGATGCACC GCGAGGGATT CTGTGCTGTC AAAGTGACAG
 GATACGACGA TGCTACGTGG CGCTCCCTAA GAACACGACG TTTCACTGTC
VEE 2-20

1006 VEE 2-7
 ACACATTGAA CGGGGAGAGG GTCTCTTTTC CCGTGTGCAC GTATGTGCCA
 TGTGTAACCT GCCCCTCTCC CAGAGAAAAG GGCACACGTG CATAACGGT
VEE 2-19

1056 VEE 2-8
 GCTACATTGT GTGACCAAAT GACTGGCATA CTGGCAACAG ATGTCAGTGC
 CGATGTAACA CACTGGTTTA CTGACCGTAT GACCGTGTGC TACAGTCACG
VEE 2-18

VEE 2-9

1106 GGACGACGCG CAAAAACTGC TGGTTGGGCT CAACCAGCGT ATAGTCGTCA
 CCTGCTGCGC GTTTTTGACG ACCAACCCGA GTTGGTCCGA TATCAGCAGT
VEE 2-17

VEE 2-10

1156 ACGGTGCGCAC CCAGAGAAAC ACCAATACCA TGAAAAATTA CCTTTTGCCC
 TGCCAGCGTG GGTCTCTTTG TGGTTATGGT ACTTTTTAAT GGAAAACGGG

VEE 2-11

1206 GTAGTGGCCC AGGCATTTGC TAGGTGGGCA AAGGAATATA AGGAAGATCA
 CATCACCGGG FCCGTAAACG ATCCACCCGT TTCCTTATAT TCCTTCTAGT
VEE 2-16

VEE 2-12

1256 AGAAGATGAA AGGCCACTAG GACTACGAGA TAGACAGTTA GTCATGGGGT
 TCTTCTACTT TCCGGTGATC CTGATGCTCT ATCTGTCAAT CAGTACCCCA
VEE 2-15

VEE 2-13

1306 GTTGTGGGC TTTTAGAAGG CACAAGATAA CATCTATTTA TAAGCGCCCG
 CAACAACCCG AAAATCTTCC GTGTTCTATT GTAGATAAAT ATTCGCGGGC
VEE 2-14

1356 GATACA
 CTATGTGCGC

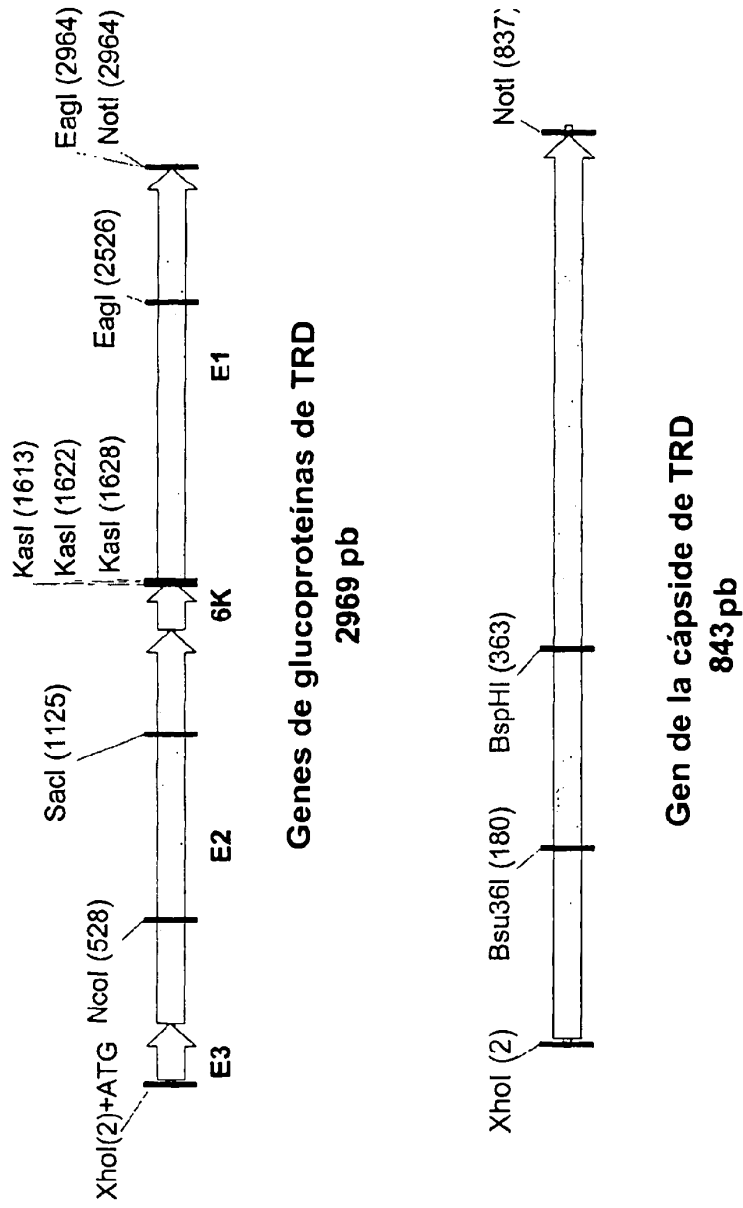


FIGURA 3

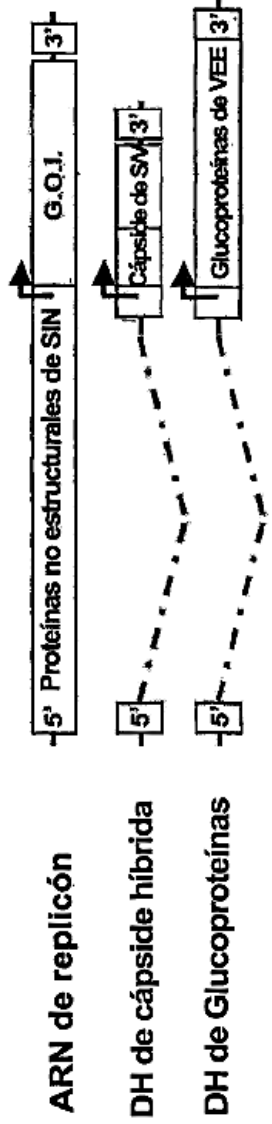
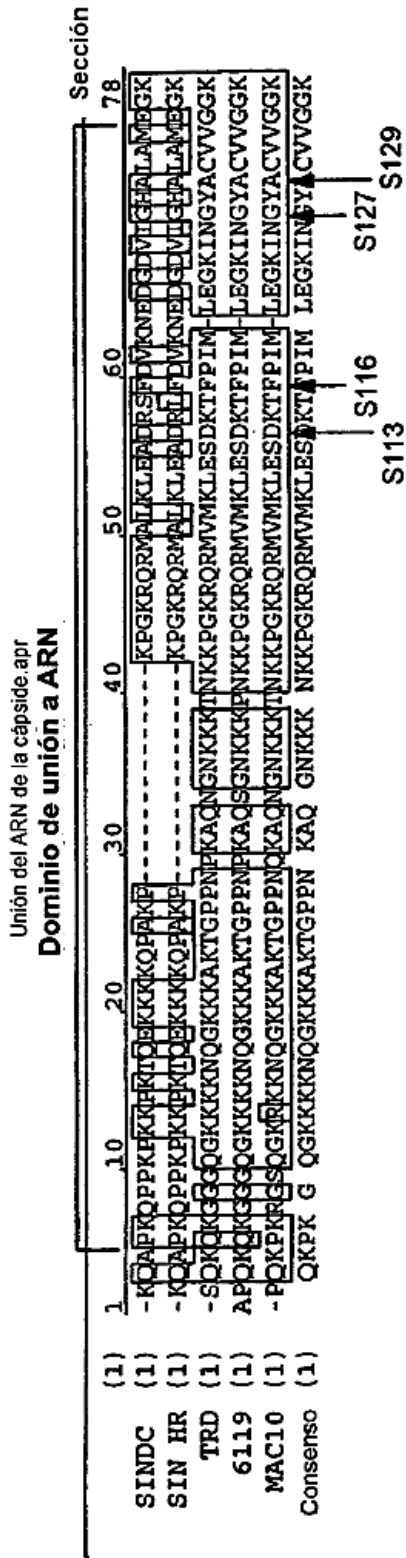


FIGURA 4

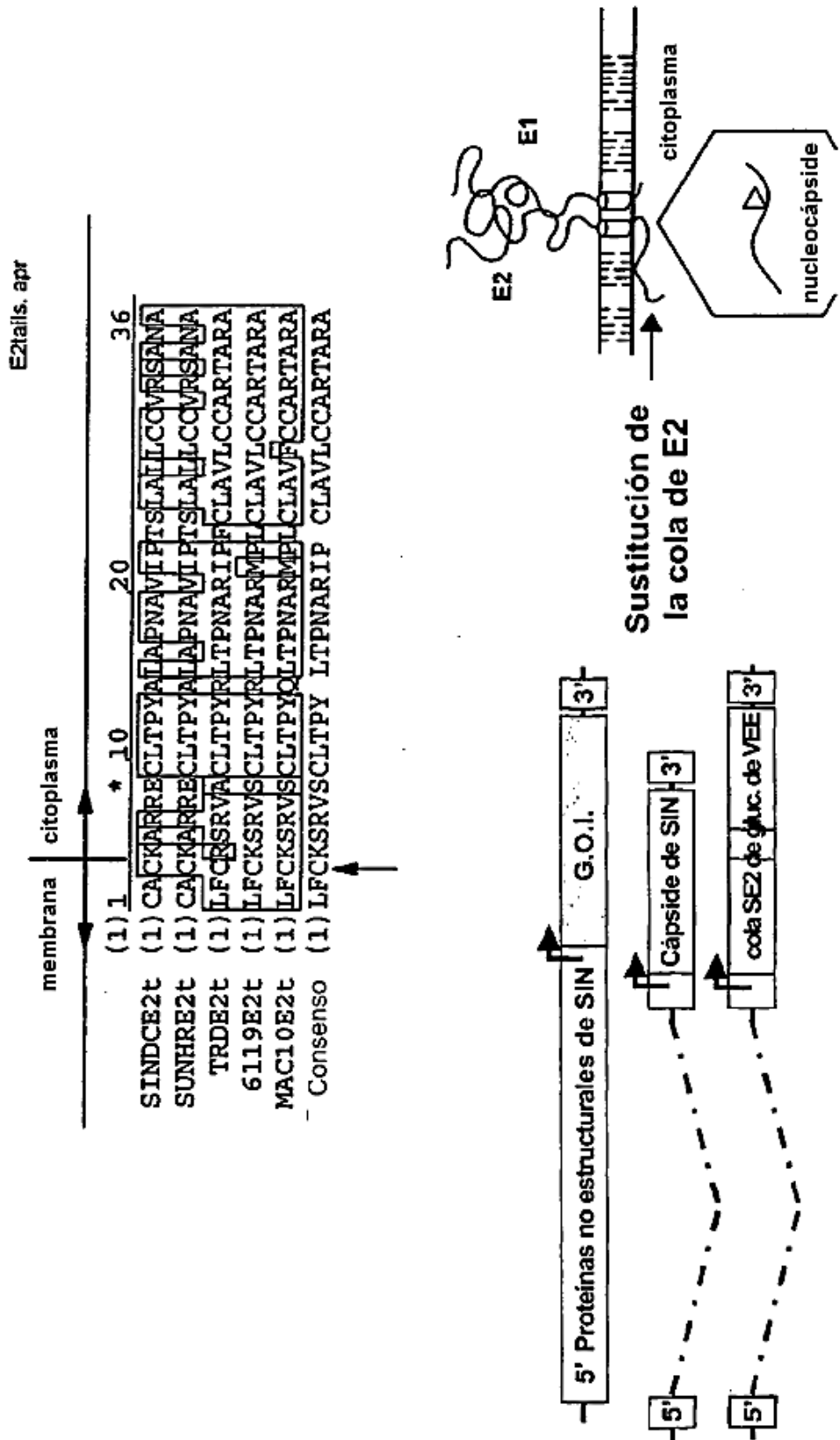


FIGURA 5

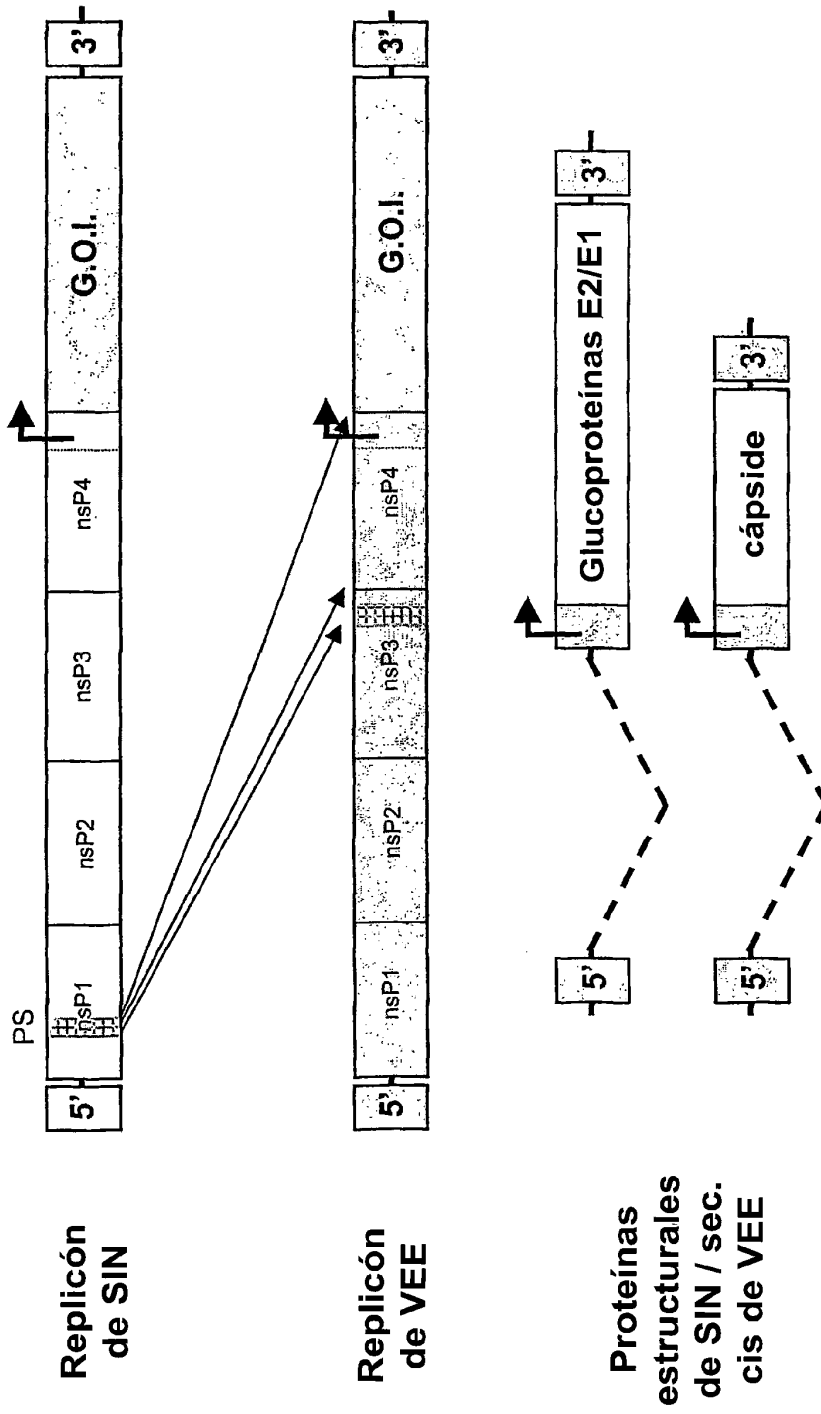


FIGURA 6

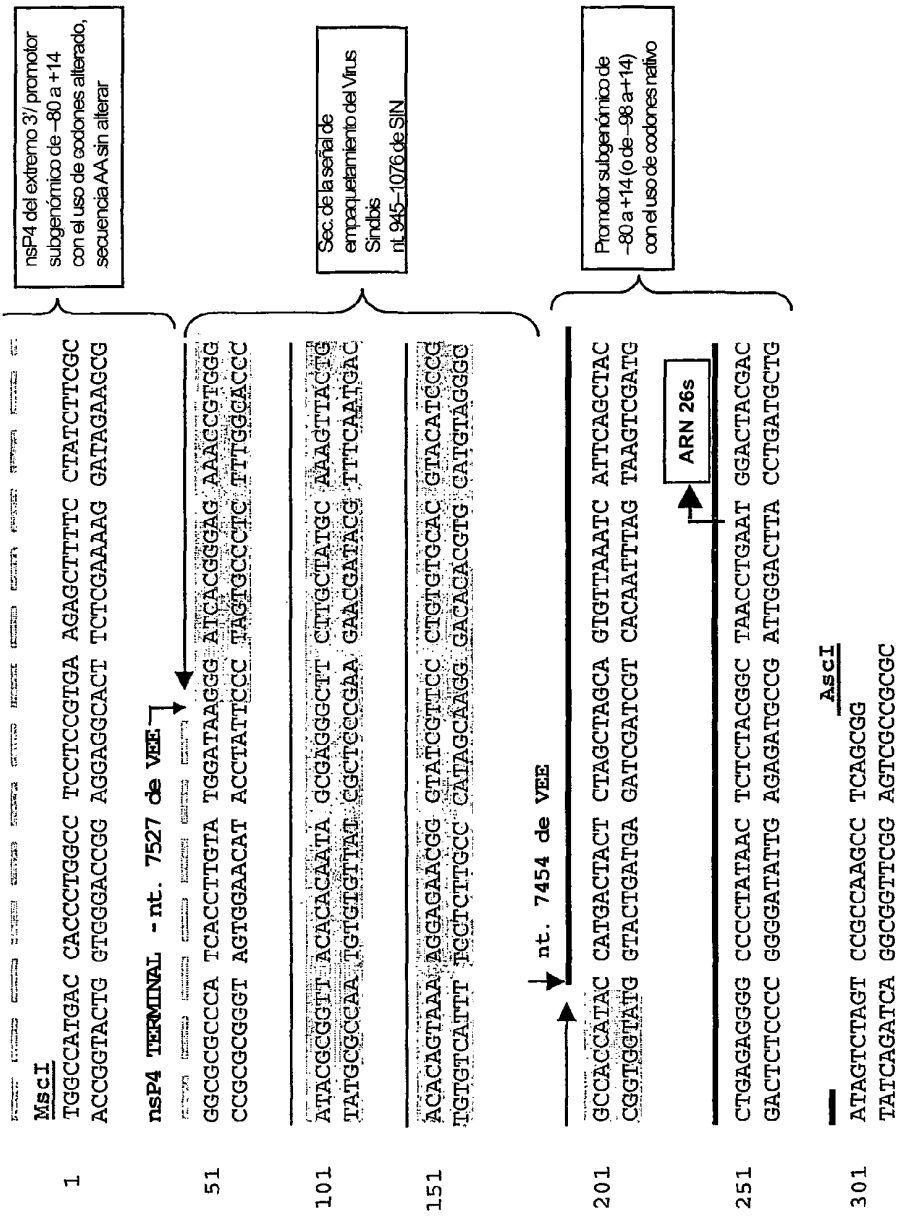


FIGURA 7

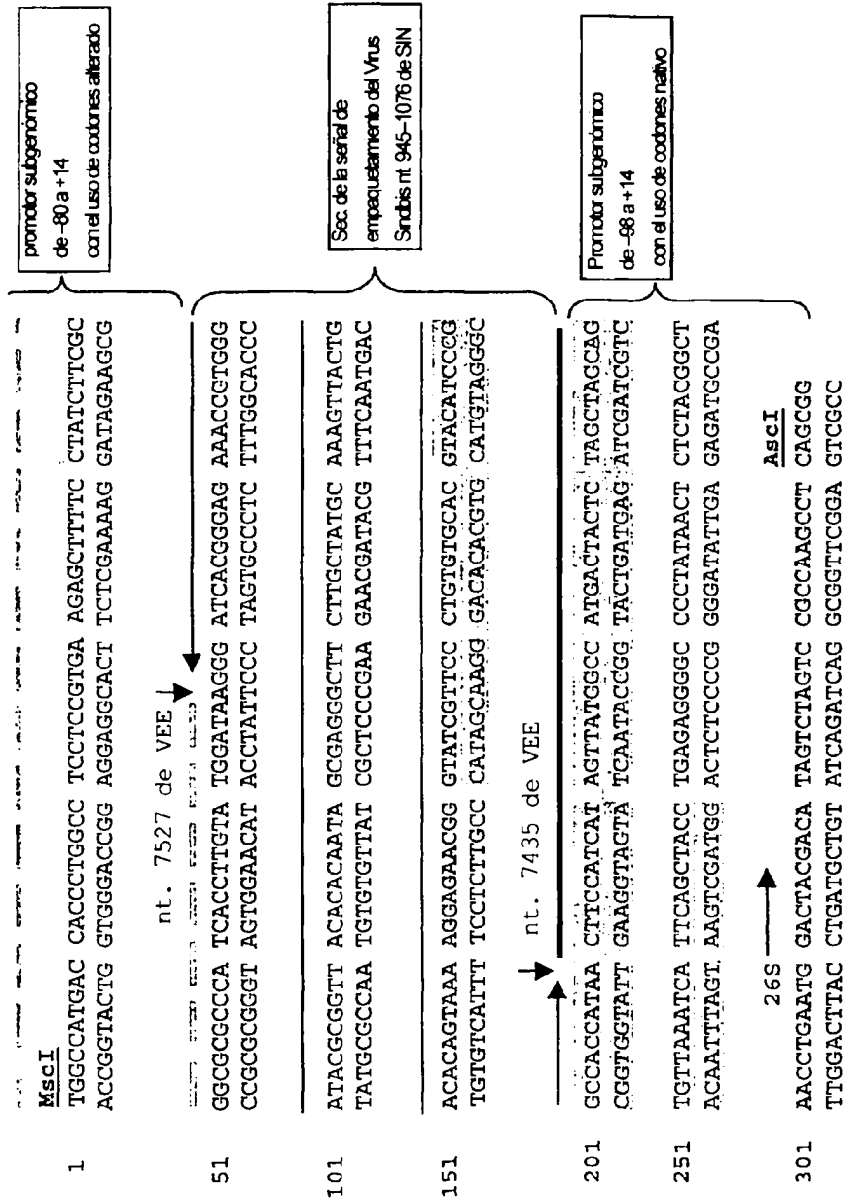
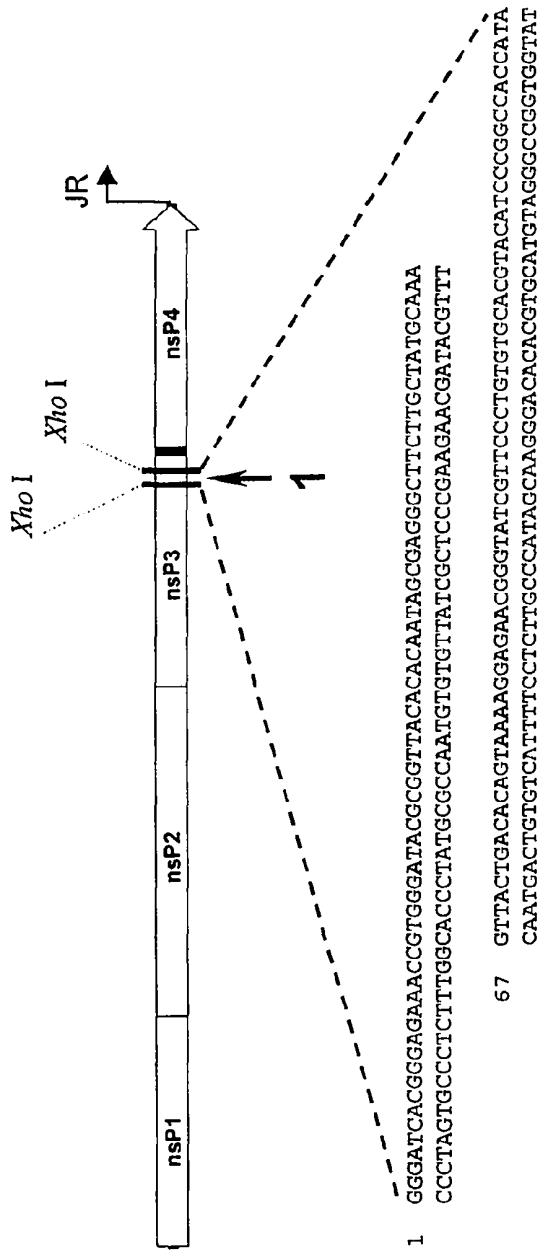


FIGURA 8



Sec. de empaquetamiento de Sindbis de núcleo de 132 nt

FIGURA 9

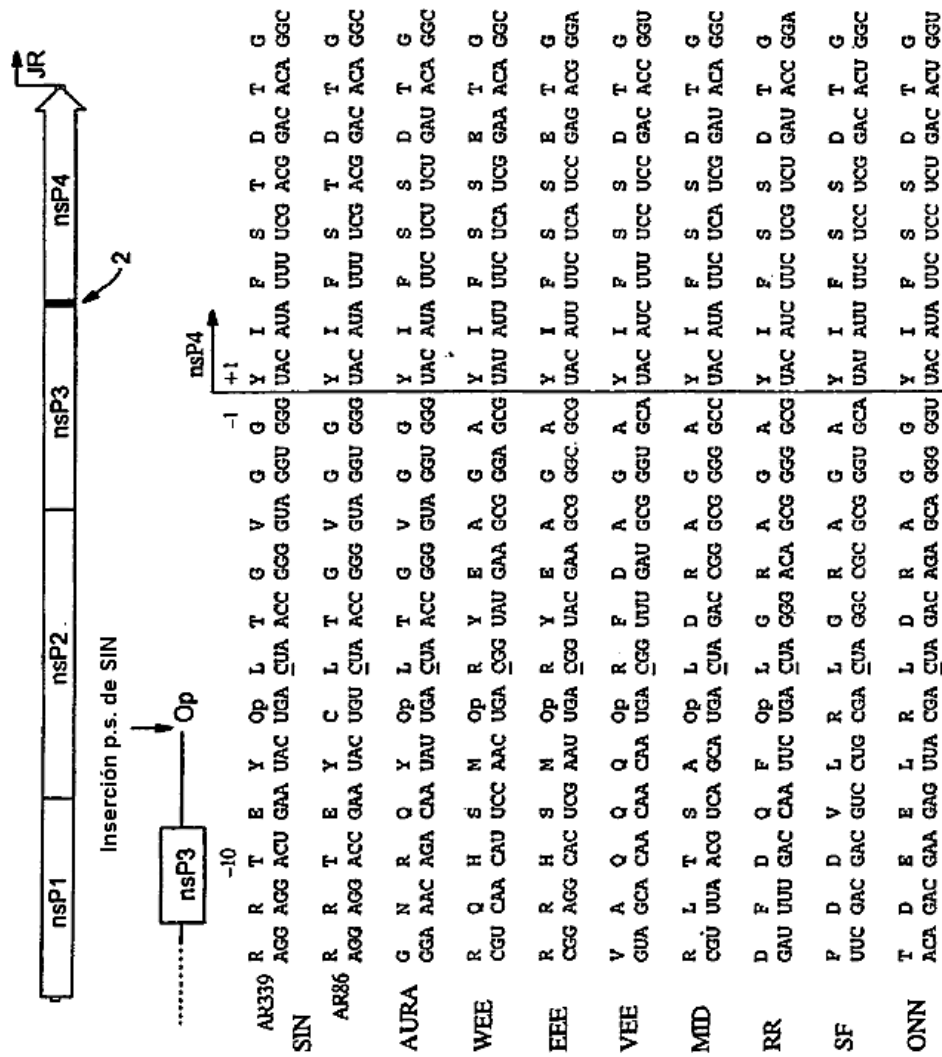
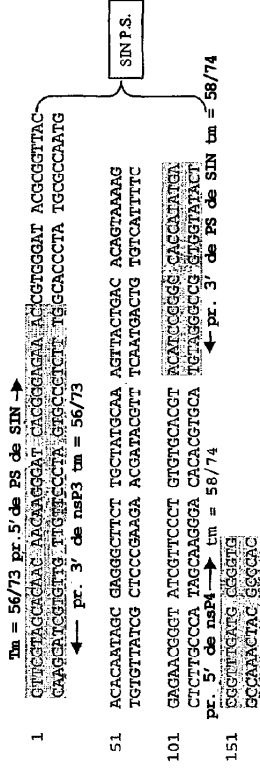


FIGURA 10

A. { Cebador PCR de 5' para nsp3 } : usar pCR2-9057b



Cebadores para el sitio de empaquetamiento de
 B. Sindbis con extensiones de nsp3 (5') o nsp4 (3').
 Usar pSINCP para el molde p.s. de SIN



C. { Cebador PCR de 3' para nsp4 } : usar pCR2-9057b para el molde



FIGURA 11

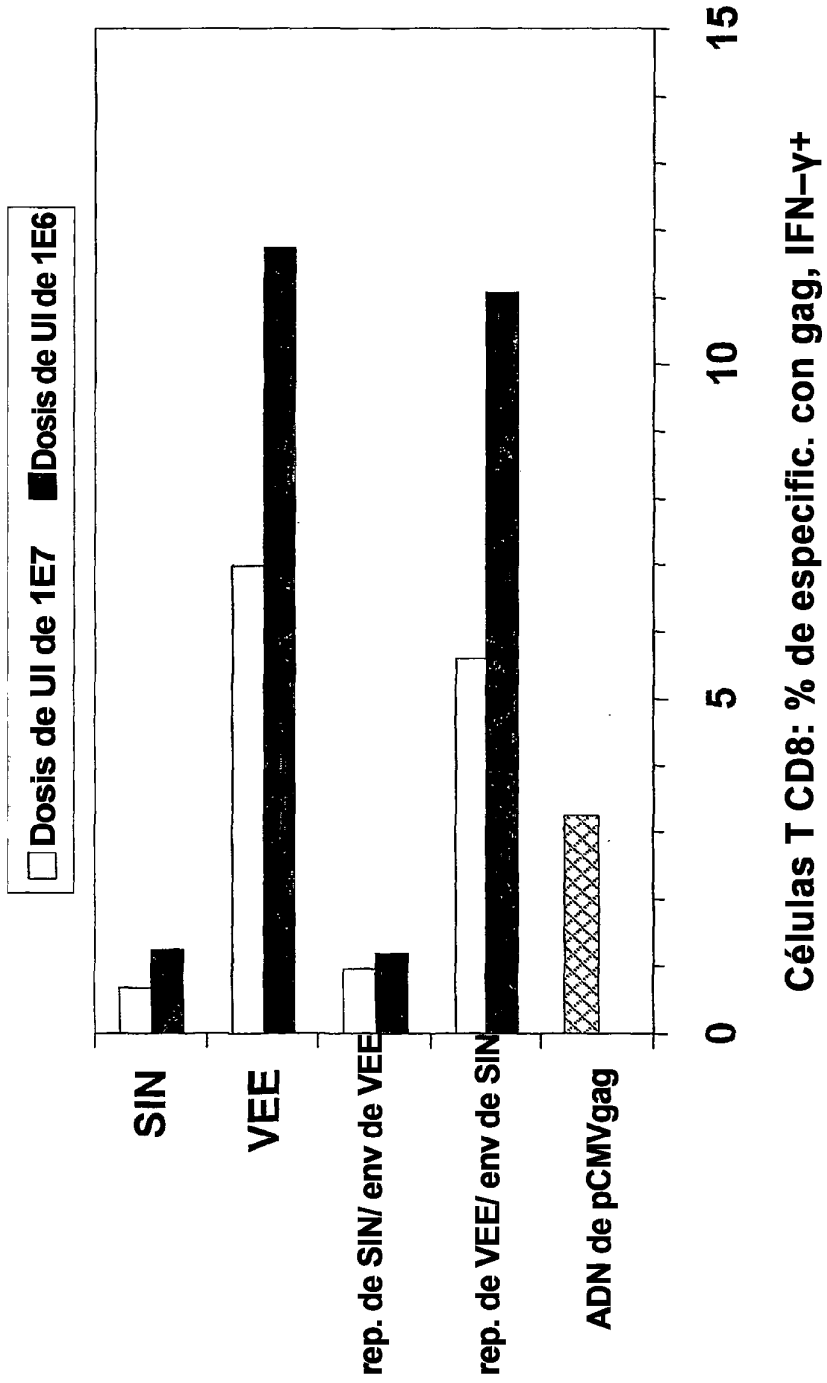


FIGURA 12