

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 647 491**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/02 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/295 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2005 E 14189933 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2848692**

(54) Título: **Vectores del alfavirus para las vacunas del virus de la gripe**

(30) Prioridad:

**21.05.2004 US 573433 P
12.01.2005 US 643737 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2017

(73) Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.
(100.0%)
4560 Horton Street
Emeryville, CA 94608-2916, US**

(72) Inventor/es:

**PERRI, SILVIA;
POLO, JOHN;
UEMATSU, YASUSHI y
GREER, CATHERINE**

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 647 491 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).

Vectores del alfavirus para las vacunas del virus de la gripe**Descripción**5 Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere en general a composiciones y métodos para estimular una respuesta inmune a patógenos respiratorios. En particular, la invención se refiere a replicones de alfavirus, construcciones de vector de alfavirus, partículas de replicón de alfavirus que expresan uno o más antígenos derivados de patógenos respiratorios. Las composiciones descritas en este documento son útiles para generar una respuesta inmune (por ejemplo, profiláctica y/o terapéutica) contra uno o más patógenos respiratorios.

Fondo

15 [0002] Los alfavirus comprenden un conjunto de virus transmitidos por artrópodos relacionados genéticamente, estructuralmente y serológicamente de la familia *Togaviridae*. Al menos veintiséis virus y subtipos de virus conocidos han sido clasificados dentro del género alfavirus, incluyendo el virus Sindbis, el virus Forest Semliki (SFV), el virus Ross River (RR) y el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE).

20 [0003] El virus Sindbis es el miembro prototípico del género *alfavirus* de la familia *Togaviridae*. Su estrategia de replicación ha sido bien caracterizada en una variedad de células cultivadas y sirve como un modelo para otros alfavirus. Brevemente, el genoma de Sindbis (al igual que otros alfavirus) es una molécula de ARN de sentido positivo de cadena sencilla de aproximadamente 12 kb que está coronada, poliadenilada y contenida dentro de una concha de proteína de cápsida codificada por virus. La nucleocápsida está rodeada además por una envoltura lipídica derivada del huésped, en la que dos glicoproteínas específicas de virus, E1 y E2, se insertan y anclan mediante una cola citoplasmática a la nucleocápsida. Ciertos alfavirus (por ejemplo, SFV) también mantienen una proteína adicional, E3, que es un producto de escisión de la proteína precursora E2, PE2.

30 [0004] Después de la adsorción de partículas de virus a las células diana, la penetración y sin recubrimiento de la nucleocápsida para liberar el ARN genómico viral en el citoplasma, el proceso de replicación es mediado por las cuatro proteínas alfavirales no estructurales (NSP) y sus precursores, traducidos del extremo 5' dos tercios del genoma viral. La síntesis de un ARN de cadena negativa de longitud completa, a su vez, proporciona una plantilla para la síntesis de ARN genómico de cadena positiva adicional y un ARN subgenómico 26S abundantemente expresado, iniciado internamente en el promotor de la región de la unión subgenómica. Las proteínas estructurales del alfavirus se traducen a partir del ARN 26S subgenómico, que representa la tercera parte del genoma, y como las nsPs, se procesan después de la traducción en las proteínas individuales, cápsida, E1 y E2 (pE2).

40 [0005] Entre los agentes patógenos por virus respiratorios, varios enfoques se han dado a conocer para la utilización de las vacunas basadas en vector de replicón de alfavirus como un medio para estimular las respuestas inmunes contra virus respiratorios, tales como influenza (FLU), virus sincitial respiratorio (RSV) y el virus de parainfluenza (PIV). Más específicamente, entre los diversos estudios relacionados con la FLU, cada uno se ha enfocado exclusivamente en el uso de vectores de replicón que expresan un único antígeno HA o un solo antígeno NP (véase Huckriede et al., 2004, Vaccine, 22: 1104-13; Berglund et al., 1999, Vaccine 17: 497 - 507, Berglund et al., 1998, Nat. Biotechnol., 16: 562- 565, Pushko et al., 1997, Virology 239: 389 - 401, Zhou et al., 1995, PNAS 92: 3009 - 3013, Vignuzzi et al., 2001, J. Gen. Virol. 82: 1737 - 1747, Schultz - Cherry et al., 2000, Virology 278: 55 - 59).

50 [0006] El uso de estrategias basadas en alfavirus que incorporan genes que codifican antígenos de gripe alternativos distintos de HA o NP para estimular una respuesta inmune, o composiciones o vacunas que incorporan genes que codifican más de un antígeno de gripe inmunogénico basado en alfavirus, no se han descrito. Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar las vacunas de gripe basadas en alfavirus que aborden estas deficiencias.

60 [0007] Como una estrategia de vacuna contra el RSV, vectores de alfavirus que expresan cualquiera de los antígenos de G o F han sido examinados (patentes de EE.UU. nº 6060308A, 6428324B1, y 6475780B1; Aplicaciones PCT WO9911808 y WO 9925858; Andersson et al, 2000, FEMS Immunol. Med. Micro. 29: 247 -253, Fleeton et al., 2001, J. Infect. Dis. 183: 1395 - 1398). De forma similar para PIV, se han sugerido vectores que expresan los antígenos HN o F (Patentes de Estados Unidos Nº 6060308A, 6428324B1 y 6475780B1; solicitudes PCT WO9911808 y WO 9925858). Sin embargo, no se ha descrito el uso de estrategias basadas en alfavirus que incorporen antígenos de VRS o PIV alternativos distintos de HN, G o F para estimular una respuesta inmune, o composiciones inmunógenas o vacunas basadas en alfavirus que combinen múltiples antígenos de VRS y PIV.

65 [0008] Sigue existiendo la necesidad de composiciones y métodos de fabricación y uso de vectores de replicón del alfavirus, construcciones de vector y partículas de replicón como un medio para estimular de manera más eficaz una respuesta inmunitaria a patógenos respiratorios tales como virus, bacterias y hongos, y para las vacunas que comprenden tales vectores basados en alfavirus. Además, sigue existiendo la necesidad de composiciones y métodos de fabricación y utilización de vectores de replicón de alfavirus y partículas de replicón en combinación eficaz o como construcciones de coexpresión, como medio para estimular una respuesta inmune contra más de un

patógeno respiratorio (por ejemplo, inmunógeno de combinación o vacuna), y para vacunas que comprenden tales replicones basados en alfavirus.

Resumen

- 5 [0009] la invención en su sentido más amplio se define como en las reivindicaciones independientes. Patógenos respiratorios, tales como virus respiratorios, bacterias y hongos, son dianas adecuadas para los enfoques de vacunas basadas en vectores de replicón de alfavirus. Los patógenos respiratorios del virus pueden incluir, por ejemplo, virus de la influenza (FLU), virus respiratorio sincitial (RSV), virus de la parainfluenza (PIV), coronavirus del SRAS (SARS-CoV), metapneumovirus humano (HMPV) y similares.
- 10 [0010] Mientras que la aplicación comercial principal de tales enfoques basados en el replicón sería vacunas profilácticas humanas, la presente invención también contempla el uso de estrategias análogas para aplicación veterinaria, de las cuales han sido identificados numerosos agentes patógenos respiratorios de los animales de los grupos de virus anteriores y caracterizados, como por ejemplo en vacas, caballos, cerdos, aves de corral, perros y gatos. Ejemplos específicos no limitativos de patógenos de virus respiratorios en el campo veterinario incluyen virus de influenza, virus de parainfluenza, virus de la bronquitis infecciosa aviar, virus sincicial respiratorio bovino, virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino, virus del herpes equino, virus de la rinotraqueítis bovina, y el calicivirus felino.
- 15 [0011] La presente invención incluye composiciones que comprenden vectores de replicón del alfavirus, constructos de vector de alfavirus y partículas de replicones de alfavirus comprenden dos o más secuencias heterólogas que codifican combinaciones de proteínas derivadas de uno o más virus de la gripe.
- 20 [0012] En un aspecto, los constructos de vector de alfavirus comprenden (i) un primer ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína de virus de la gripe, y (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína de virus de la gripe, en el que dicha segunda secuencia de ácido nucleico heterólogo es diferente de dicha primera secuencia de ácido nucleico heterólogo.
- 25 [0013] Las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento comprenden combinaciones de secuencias heterólogas, incluyendo, pero no limitadas a, secuencias heterólogas que codifican la misma proteína de diferentes cepas del patógeno (por ejemplo., Proteínas de gripe HA de diferentes cepas, incluyendo cepas que están causando o tienen el potencial de causar pandemias); o secuencias heterólogas que codifican diferentes proteínas del mismo patógeno (por ejemplo., proteínas de gripe H1 y H2). Ha de entenderse que las combinaciones exemplificadas en este documento son solamente ejemplares y que cualquier combinación de proteínas del virus de la gripe puede ser utilizada.
- 30 [0014] Según la presente invención, las secuencias heterólogas se incluyen en los mismos vectores de replicón del alfavirus, constructos de vectores o partículas. Por ejemplo, uno o más antígenos de influenza (por ejemplo, proteínas NA y/o HA) pueden codificarse mediante una construcción o una partícula de alfavirus como se describe aquí. Cuando se incluyen antígenos múltiples, los antígenos pueden derivarse de múltiples cepas pandémicas (o potencialmente pandémicas) y/o de cepas de influenza interpandémicas (también denominadas "anuales"). Las composiciones son útiles para generar una respuesta inmunitaria protectora y/o terapéutica en un sujeto frente a una pandemia potencial y/o para proporcionar una vacuna eficaz contra múltiples cepas. Debido a que las composiciones descritas en la presente memoria incluyen una gama más amplia de antígenos que las vacunas de la gripe basadas en huevos tradicionales (que están típicamente limitadas a 3 antígenos y por el suministro de huevo), pueden proporcionar protección mejorada. Además, debido a que las composiciones aquí descritas permiten incluir una gama más amplia de antígenos, reducen o eliminan la necesidad de reformular anualmente las vacunas contra la gripe, por ejemplo en respuesta al cambio antigénico. El aumento de la potencia, tal como en individuos ancianos, jóvenes o comprometidos inmunológicamente también puede ser proporcionado por las composiciones de la presente invención.
- 35 [0015] Por lo tanto, será evidente que la capacidad de las composiciones descritas en el presente documento para incluir múltiples proteínas antigénicas de una o más cepas de influenza (por ejemplo, múltiples antígenos de la gripe pandémica y/o interpandémica) permiten la generación de respuestas inmunes contra una amplia gama de cepas que las descritas anteriormente. También será evidente que las composiciones descritas en la presente memoria pueden unirse en una variedad de combinaciones, incluyendo, pero no limitándose a, en administraciones de cebado antes de impulsar administraciones con una o más composiciones inmunógenas adicionales.
- 40 [0016] En ciertas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento pueden unirse como administraciones de cebado y proteínas utilizadas como refuerzo. Las proteínas potenciadoras pueden incluir una o más de las proteínas codificadas por las secuencias heterólogas y/o proteínas adicionales. Por ejemplo, las composiciones que se describen aquí incluyendo secuencias heterólogas que codifican múltiples proteínas antigénicas de la de gripe (pandémicas y/o interpandémicas) pueden administrarse una o más veces antes de la administración de una o más proteínas de la de gripe (por ejemplo, vacunas de la de gripe de 3 antígenos tradicionales).
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

5 [0017] Alternativamente, las composiciones descritas en este documento pueden unirse en cebado y refuerzo. Por ejemplo, las composiciones como se describen aquí que incluyen secuencias heterólogas que codifican múltiples proteínas antigenicas de la de gripe de cepas pandémicas pueden administrarse antes de composiciones como se describen aquí incluyendo secuencias heterólogas que codifican proteínas de la de gripe de antígenos múltiples de cepas interpandémicas.

[0018] En cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria, más de un cebador puede ser seguido por más de un impulso.

10 [0019] Por consiguiente, la presente invención proporciona, pero no se limita a, las siguientes realizaciones numeradas:

1. Una composición inmunogénica, que comprende: (a) un vector de replicón de alfavirus que comprende (i) un primer ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína del virus de la gripe, y (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína del virus de la gripe, la secuencia de ácido nucleico es diferente de dicha primera secuencia de ácido nucleico heterólogo; y (b) un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 2. La composición inmunogénica de la realización 1, en la que dichos primer y segundo antígenos proteicos se selecciona independientemente del grupo que consiste de: una hemaglutinina (HA), una neuraminidasa (NA), una nucleocápsida (NP), una proteína de matriz (M1), una proteína de canal iónico (M2), NS1, NS2, PB1, PB2, PA, un fragmento inmunogénico del mismo.
- 20 3. La composición inmunogénica de la realización 1 o realización 2, en la que dicho primer antígeno proteico es una hemaglutinina (HA) de la gripe o fragmento inmunogénico del mismo.
- 25 4. La composición inmunogénica de cualquiera de las realizaciones 1-3, en la que dicho primer ácido nucleico heterólogo es de un virus de la gripe que tiene un subtipo seleccionado del grupo que consiste en H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14 y H15.
- 30 5. La composición inmunogénica de cualquiera de las realizaciones 1-4, en la que dicho segundo antígeno proteico es una neuraminidasa de influenza (NA) o fragmento inmunogénico del mismo.
- 35 6. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que dicho segundo ácido nucleico heterólogo es de un virus de la gripe que tiene un subtipo seleccionado del grupo que consiste en subtipos N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, y N9.
- 40 7. La composición inmunogénica de cualquiera de las realizaciones 1-6, en la que dicho primer antígeno proteico es una hemaglutinina de la gripe o fragmento inmunogénico de la misma, y dicho segundo antígeno proteico es una neuraminidasa de la gripe o fragmento inmunogénico de la misma.
- 45 8. La composición inmunogénica de cualquiera de las realizaciones 1-7, en la que la primera secuencia de ácido nucleico y/o segunda secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a un promotor subgenómico de alfavirus.
9. La composición inmunogénica de cualquiera de las realizaciones 1-8, en la que la primera, la segunda o ambas secuencias de ácido nucleico heterólogas comprenden además un sitio interno de entrada de ribosomas (IRES).
- 50 10. La composición inmunogénica de cualquiera de las realizaciones 1-9, en la que el vector de replicón de alfavirus se deriva de un alfavirus seleccionado del grupo que consiste en: un virus Sindbis, un virus Forest Semliki, un virus encefalitis equino venezolano y un virus Ross River.
11. La composición inmunogénica de cualquiera de las realizaciones 1-10 para uso en la estimulación de una respuesta inmunitaria profiláctica en un mamífero.
- 55 12. La composición inmunogénica para el uso de la realización 11, además para uso en combinación con una segunda composición inmunogénica que comprende:
 - a. un antígeno proteico o fragmento inmunogénico del mismo, de la misma cepa de influenza que el primer antígeno proteico; y
 - b. un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Estos y otros aspectos y realizaciones de la invención se harán evidentes haciendo referencia a la siguiente descripción detallada, Figuras adjuntas y diversas referencias aquí expuestas que describen con más detalle ciertos procedimientos o composiciones (por ejemplo, plásmidos, secuencias, etc.).

Breve descripción de las figuras

[0020]

- 60 FIG. 1 es una ilustración esquemática que representa la configuración general de vectores de replicón de alfavirus representativos y componentes de envasado usados para generar partículas de replicón de alfavirus.
- FIG. 2 es una ilustración esquemática de vectores de replicón de alfavirus representativos que codifican uno o más antígenos del virus de la gripe.
- 65 FIG. 3 es una ilustración esquemática de vectores de replicón de alfavirus representativos que codifican uno o más antígenos del virus de parainfluenza.
- FIG. 4 es una ilustración esquemática de vectores de replicón de alfavirus representativos que codifican uno o

más antígenos del virus respiratorio sincitial.

FIG. 5 es una ilustración esquemática de vectores de replicón de alfavirus representativos que codifican antígenos seleccionados de al menos dos patógenos de virus respiratorios diferentes.

FIG. 6 es un gráfico que muestra los títulos de anticuerpos específicos de de gripe HA en ratones inmunizados con partículas de replicón de alfavirus en comparación con el antígeno de vacuna de subunidad de HA convencional.

FIG. 7 es un gráfico que muestra anticuerpos neutralizantes específicos de la de gripe (determinados como títulos HI) en ratones inmunizados con partículas de replicón de alfavirus en comparación con el antígeno de vacuna de subunidad HA.

FIG. 8 es un gráfico que compara la inmunogenicidad de diversas dosis de partículas de replicón SIN y VEE/SIN que expresan el antígeno HA de la FLU.

FIG. 9 es un gráfico que muestra la protección de ratones contra la inoculación de virus de la de gripe intranasal después de la inmunización con partículas de replicón de alfavirus que expresan de gripe HA o NA.

FIG. 10 es un gráfico que muestra la inducción de anticuerpos neutralizantes de la de gripe en macacos rhesus inmunizados con partículas de replicón VEE/SIN que expresan antígeno HA de la FLU.

FIG. 11 es un gráfico que muestra la expresión dual de de gripe HA y NA a partir de partículas de replicón VEE/SIN bicistrónicas, utilizando tanto promotores subgenómicos duplicados como un elemento IRES.

FIG. 12 es un gráfico que muestra la inducción de respuestas de anticuerpo específico de PIV en ratones inmunizados IM, IN o IN seguido de IM con partículas de replicón que expresan antígeno HN de PIV.

FIG. 13 es un gráfico que muestra la inducción de respuestas de anticuerpo PIV en ratones inmunizados con dosis decrecientes de partículas de replicón de alfavirus que expresan HN.

FIG. 14 es un gráfico que muestra la inducción del anticuerpo específico de PIV en ratones inmunizados con una vacuna de PIV inactivada con o sin adyuvante (MF59 o LTK63), y se administró IM o IN seguido de IM.

FIG. 15 es un gráfico que demuestra la inducción de respuestas de anticuerpo PIV en hámsters inmunizados una vez con partículas de replicón VEE/SIN que expresan HN o una vacuna PIV inactivada con adyuvante MF59.

FIG. 16 es un gráfico que demuestra la inducción de respuestas de anticuerpo PIV en hámsteres inmunizados dos veces con partículas de replicón VEE/SIN que expresan HN o una vacuna PIV inactivada con adyuvante MF59.

FIG. 17 es una tabla que demuestra la protección de los hámsteres contra el desafío PIV intranasal después de la inmunización con partículas de replicón VEE/SIN que expresan antígeno HN o una vacuna inactivada con adyuvante MF59.

FIG. 18 es un gráfico que muestra la inducción de respuestas de anticuerpos específicos de PIV después de la inmunización con una vacuna de combinación PIV/FLU basada en partículas de replicón de alfavirus.

FIG. 19 es un gráfico que muestra la inducción de respuestas de anticuerpos específicos de la de gripe después de la inmunización con una vacuna de combinación PIV/FLU basada en partículas de replicón de alfavirus.

FIG. 20 es un gráfico que muestra la inducción de respuestas de anticuerpos específicos de SARS y de gripe en ratones inmunizados secuencialmente con partículas de replicón de alfavirus que expresan proteína SARS S y partículas de replicón de alfavirus que expresan la proteína de gripe HA.

FIG. 21, paneles A y B, son gráficos que muestran la protección de ratones frente a la inoculación intranasal de virus de la de gripe después de la inmunización con cantidades de dosis bajas de partículas de replicón de alfavirus que expresan de gripe HA o NA.

FIG. 22 es un gráfico que representa la protección de ratones frente a la inoculación de virus de la de gripe intranasal después de la inmunización con una preparación de vacuna de partículas de replicón de alfavirus que expresa tanto los antígenos HA como NA.

FIG. 23A es un gráfico que representa la inmunogenicidad en hámsteres de una vacuna de partículas de replicón de alfavirus que expresa antígeno HN de PIV3 administrado IM o IN y la protección completa resultante de estos animales vacunados frente a desafío intranasal con virus PIV3.

FIG. 23B es una tabla que representa los resultados mostrados en el gráfico de la FIG. 23A.

FIG. 24 es un gráfico que representa la expresión dual de PIV3 HN y RSV F a partir de partículas de replicón de alfavirus bicistrónicas y de una combinación de partículas de replicón que expresan por separado PIV HN y RSVF.

FIG. 25 es un gráfico que muestra la inducción de respuestas de anticuerpos específicos de PIV después de la inmunización con una vacuna de combinación PIV/FLU basada en partículas de replicón de alfavirus.

55 Descripción detallada

[0021] La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.

[0022] La invención se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden un vector de replicón de alfavirus, un vector de alfavirus o una partícula de replicón de alfavirus que comprende al menos un ácido nucleico heterólogo que codifica un patógeno respiratorio. Las composiciones inmunogénicas (por ejemplo, vacunas) son útiles para generar una respuesta inmune cuando se administran a un sujeto.

[0023] La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Remington's

Pharmaceutical Sciences, 18^a Edición (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Methods in Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc); y Handbook of Experimental Immunology, vol. I - IV (DM Weir y CC Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2^a edición, 1989); Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, KS ed., CRC Press, 1997); Short Protocols in Molecular Biology, 4^a ed. (Ausubel et al., Eds., 1999, John Wiley&Sons); Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream et al., Eds., 1998, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2^a ed. (Newton y Graham eds., 1997, Springer Verlag); Peters y Dalrymple, Fields Virology (2^a edición), Fields et al. (eds.), BN Raven Press, Nueva York, NY.

5 [0024] Como se usa en esta memoria descriptiva, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" incluyen referencias plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una partícula" incluye una mezcla de dos o más de tales partículas.

10 [0025] Antes de exponer la invención se exponen definiciones de ciertos términos que se utilizarán más adelante.

15 [0026] Una molécula de "ácido nucleico" puede incluir, pero no se limita a, secuencias procarióticas, ARNm eucariótico u otros ARN, ADNc de ARNm eucariótico u otro ARN, secuencias de ADN genómico de ADN eucariótico (por ejemplo, mamífero), e incluso secuencias de ADN sintético. El término también captura secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN e incluye modificaciones tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservadoras en naturaleza), a la secuencia nativa. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como por mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales. Las modificaciones de polinucleótidos pueden tener cualquier número de efectos incluyendo, por ejemplo, la facilitación de la expresión del producto polipéptido en una célula huésped.

20 [0027] Los términos "polipéptido" y "proteína" se refieren a un polímero de residuos de aminoácidos y no están limitados a una longitud mínima del producto. De este modo, se incluyen dentro de la definición péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas están abarcadas por la definición. Los términos incluyen también modificaciones post-expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para los propósitos de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como supresiones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), a la secuencia nativa, siempre y cuando la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de la mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por PCR. Además, pueden realizarse modificaciones que tengan uno o más de los siguientes efectos: reducción de la toxicidad; facilitando el procesamiento celular (por ejemplo, secreción, presentación de antígenos, etc); y facilitar la presentación a células B y/o células T. Los términos polipéptido y proteína se usan indistintamente en el presente documento para designar cualquier polímero de residuos de aminoácidos. Los términos abarcan péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares. Dichos polipéptidos pueden derivarse de fuentes naturales o pueden ser sintetizados o producidos de forma recombinante.

30 40 Los términos también incluyen modificaciones post-expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación, etc.

35 [0028] Un polipéptido como se define en el presente documento se componen generalmente de los 20 aminoácidos naturales Ala (A), Arg (R), Asn (N), Asp (D), Cys (C), Gln (Q), Glu ((G), His (H), Ile (I), Leu (L), Lys (K), Met (M), Phe (F), Pro (P), Ser (S), Thr (T), Trp (W), Tyr (Y) y Val (V) y pueden incluir también cualquiera de los varios análogos de aminoácidos conocidos, análogos tanto naturales como sintetizados, tales como, pero sin limitarse a, homoisoleucina, asaleucina, 2-(metilenociclopropilo) glicina, S-metilcisteína, S-(prop-1-enilo)cisteína, homosarina, ornitina, norleucina, norvalina, homoarginina, 3-(3-carboxifenilo)alanina, ciclohexilanina, mimosina, ácido pipecólico, ácido 4-metilglutámico, canavanina, ácido 2,3-diaminopropiónico y similares. Otros ejemplos de agentes polipéptidos que encontrarán uso en la presente invención se exponen a continuación.

40 [0029] Por polipéptido de "tipo salvaje", agente polipéptido o fármaco de polipéptido, se entiende una secuencia de polipéptido de origen natural (y, opcionalmente, su estructura secundaria correspondiente). Una proteína o polipéptido "aislado" o "purificado" es una proteína que está separada y discreta de un organismo completo con el que la proteína está normalmente asociada en la naturaleza. Es evidente que el término denota proteínas de varios niveles de pureza. Típicamente, una composición que contiene una proteína purificada será una en la que al menos aproximadamente 35%, preferiblemente al menos aproximadamente 40-50%, más preferiblemente al menos aproximadamente 75-85%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 90% o más, de la proteína total en la composición será la proteína en cuestión.

45 60 [0030] "Enlazado operativamente" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes así descritos están configurados de modo que realizan su función habitual. Por lo tanto, un promotor dado unido operativamente a una secuencia codificadora es capaz de efectuar la expresión de la secuencia codificante cuando están presentes las enzimas apropiadas. El promotor no necesita ser contiguo con la secuencia codificante, siempre que funcione para dirigir su expresión. Así, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias intervenidas no traducidas pero transcritas entre la secuencia promotora y la secuencia codificadora y la secuencia promotora

pueden considerarse todavía "unidas operativamente" a la secuencia codificante.

[0031] Las técnicas para determinar la "similitud" de secuencia de ácido amino son bien conocidas en la técnica. En general, "similitud" significa la comparación exacta de aminoácidos a aminoácidos de dos o más polipéptidos en el lugar apropiado, donde los aminoácidos son idénticos o poseen propiedades químicas y/o físicas similares tales como carga o hidrofobicidad. Entonces se puede determinar una "similitud porcentual" denominada entre las secuencias polipeptídicas comparadas.

[0032] Las técnicas para determinar el ácido nucleico y la identidad de secuencia de aminoácidos también son bien conocidas en la técnica e incluyen determinar la secuencia de nucleótidos del ARNm para ese gen (usualmente a través de un ADNc intermedio) y determinar la secuencia de aminoácidos codificada de ese modo, y comparar esto a una segunda secuencia de aminoácidos. En general, "identidad" se refiere a una correspondencia exacta de nucleótidos a aminoácidos o de aminoácidos a aminoácidos de dos polinucleótidos o secuencias de polipéptidos, respectivamente.

[0033] Dos o más secuencias de polinucleótidos pueden compararse determinando su "porcentaje de identidad". También se pueden comparar dos o más secuencias de aminoácidos determinando su "identidad porcentual". El porcentaje de identidad de dos secuencias, ya sean secuencias de ácidos nucleicos o péptidos, se describe generalmente como el número de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas divididas por la longitud de la secuencia más corta y multiplicadas por 100. Una alineación aproximada para secuencias de ácido nucleico se proporciona por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics 2: 482-489 (1981). Este algoritmo puede ampliarse para usar con secuencias peptídicas usando la matriz de puntuación desarrollada por Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure, M.O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3: 353 - 358, National Bio-medical Research Foundation, Washington, DC, EE.UU., y normalizado por Gribskov, Nucl. Acids Res. 14 (6): 6745 - 6763 (1986). Una implementación de este algoritmo para secuencias de ácidos nucleicos y péptidos es proporcionada por Genetics Computer Group (Madison, WI) en su aplicación de utilidad BestFit. Los parámetros por defecto para este método se describen en el Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Versión 8 (1995) (disponible de Genetics Computer Group, Madison, WI). Otros programas igualmente adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias son generalmente conocidas en la técnica.

[0034] Por ejemplo, el porcentaje de identidad de una secuencia de nucleótidos particular a una secuencia de referencia se puede determinar utilizando el algoritmo de homología de Smith y Waterman con una tabla de puntuación por defecto y una penalización por hueco de seis posiciones de nucleótidos. Otro método para establecer el porcentaje de identidad en el contexto de la presente invención consiste en usar el paquete MPSRCH de programas con derechos de autor de la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). A partir de este conjunto de paquetes, se puede emplear el algoritmo Smith-Waterman donde se usan los parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalidad abierta de hueco 12, penalización de extensión de hueco de uno y brecha de seis). A partir de los datos generados, el valor "Match" refleja "identidad de secuencia". Otros programas adecuados para calcular el porcentaje de identidad o similitud entre secuencias son generalmente conocidos en la técnica, tales como el programa de alineación BLAST, que también se puede usar con parámetros predeterminados. Por ejemplo, BLASTN y BLASTP se pueden utilizar con los siguientes parámetros por defecto: código genético = estándar; filtro = ninguno; filamento = ambos; límite = 60; espera = 10; matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; ordenar por = puntuación alta; bases de datos = no redundante, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + traducciones GenBank CDS + proteína suiza + Spupdate + PIR. Los detalles de estos programas se pueden encontrar en la siguiente dirección de Internet: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

[0035] Un experto en la técnica puede determinar fácilmente los parámetros de búsqueda apropiados a usar para una secuencia dada en los programas anteriores. Por ejemplo, los parámetros de búsqueda pueden variar en función del tamaño de la secuencia en cuestión. Así, por ejemplo, una realización representativa de la presente invención incluiría un polinucleótido aislado que tiene X nucleótidos contiguos, en donde (i) los X nucleótidos contiguos tienen al menos aproximadamente 50% de identidad con Y nucleótidos contiguos derivados de cualquiera de las secuencias descritas en la presente memoria, (ii) X es igual a Y, y (iii) X es mayor o igual a 6 nucleótidos y hasta 5000 nucleótidos, preferiblemente mayor o igual a 8 nucleótidos y hasta 5000 nucleótidos, más preferiblemente 10-12 nucleótidos y hasta 5000 nucleótidos, e incluso más preferiblemente 15-20 nucleótidos, hasta el número de nucleótidos presentes en las secuencias de longitud completa descritas aquí, incluyendo todos los valores enteros que se ubican dentro de los intervalos descritos anteriormente.

[0036] Dos fragmentos de ácido nucleico se consideran "hibridar selectivamente" tal como se describe en el presente documento. El grado de identidad de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico afecta la eficacia y fuerza de los eventos de hibridación entre dichas moléculas. Una secuencia de ácido nucleico parcialmente idéntica inhibirá al menos parcialmente una secuencia completamente idéntica a la hibridación con una molécula diana. La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente idéntica se puede evaluar usando ensayos de hibridación que son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, transferencia Southern, transferencia Northern, hibridación en solución o similares, véase Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, (1989) Cold Spring Harbor, NY). Dichos ensayos se pueden llevar a cabo utilizando diversos grados de selectividad, por ejemplo,

usando condiciones que varían desde una severidad baja a alta. Si se emplean condiciones de baja rigurosidad, la ausencia de unión no específica puede evaluarse usando una sonda secundaria que carece 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 manera que, en ausencia de acontecimientos de unión no específica, la sonda secundaria no hibridará con la diana.

[0037] Cuando se utiliza un sistema de detección basado en hibridación, una sonda de ácido nucleico se elige que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico diana, y luego mediante la selección de condiciones apropiadas, la sonda y la secuencia diana "se hibridan selectivamente", o se unen, entre sí para formar una molécula híbrida. Una molécula de ácido nucleico que es capaz de hibridarse selectivamente a una secuencia diana en "moderadamente rigurosa" típicamente se hibrida bajo condiciones que permiten la detección de una secuencia de ácido nucleico diana de al menos aproximadamente 10-14 nucleótidos de longitud que tiene 70% de identidad de secuencia de al menos aproximadamente con la secuencia de la sonda de ácido nucleico seleccionada. Condiciones de hibridación rigurosas típicamente permiten la detección de secuencias de ácidos nucleicos diana de al menos aproximadamente 10-14 nucleótidos de longitud que tienen una identidad de secuencia de más de aproximadamente el 90-95% con la secuencia de la sonda de ácido nucleico seleccionada. Las condiciones de hibridación útiles para la hibridación sonda/diana donde la sonda y la diana tienen un grado específico de identidad de secuencia, se puede determinar como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, editores BD Hames y SJ Higgins, (1985) Oxford; Washington, DC; IRL Press).

[0038] Con respecto a las condiciones de rigurosidad para la hibridación, es bien sabido en la técnica que numerosas condiciones equivalentes se pueden emplear para establecer una rigurosidad en particular variando, por ejemplo, los siguientes factores: la longitud y naturaleza de secuencias de sonda y diana, composición de bases de las diversas secuencias, concentraciones de sales y otros componentes de la solución de hibridación, la presencia o ausencia de agentes bloqueantes en las soluciones de hibridación (por ejemplo, formamida, sulfato de dextrano y polietilenglicol), parámetros de temperatura de reacción de hibridación y de tiempo, así como, variando las condiciones de lavado. La selección de un conjunto particular de condiciones de hibridación se realiza siguiendo procedimientos estándar en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, (1989) Cold Spring Harbor, NY).

[0039] El término "derivado de" se usa para identificar el origen viral de una molécula (por ejemplo, polinucleótido, polipéptido). Un primer polinucleótido está "derivado de" segundo polinucleótido si tiene la misma o sustancialmente la misma secuencia de pares de base como 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 viral o polinucleótido se "deriva de" un virus en particular (por ejemplo, las especies) si tiene (i) la misma o sustancialmente la misma secuencia que la secuencia de virus o (ii) presenta una identidad de secuencia a polipéptidos de ese virus como se describió anteriormente.

[0040] Un primer polipéptido se "deriva de" un segundo polipéptido si es (i) codificado por un primer polinucleótido derivado de un segundo polinucleótido, o (ii) presenta una identidad secuencial con los segundos polipéptidos según lo descrito anteriormente. Por lo tanto, un polipéptido de virus (proteína) se "deriva de" un virus en particular si se (i) codifica por un marco de lectura abierto de un polinucleótido de ese virus (polinucleótido viral), o (ii) muestra una identidad de secuencia, como se ha descrito anteriormente, a polipéptidos de ese virus.

[0041] Tanto moléculas de polinucleótido como de polipéptido puede derivarse físicamente del virus o producirse recombinantemente o sintéticamente, por ejemplo, en base a secuencias conocidas.

[0042] El término "heterólogo" es un término relativo, que cuando se utiliza con referencia a los ácidos nucleicos indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Así, en el caso pendiente, un ácido nucleico que codifica una proteína viral respiratoria es heterólogo a las secuencias del vector replicón de alfavirus, construcción de vector o partícula de replicón en el que está contenido.

[0043] "ARN subgenómico" se refiere a una molécula de ARN de una longitud o tamaño que es más pequeño que el ARN genómico a partir del cual se derivó. ARN subgenómico se transcribe a partir de un promotor interno cuyas secuencias residen dentro del ARN genómico o su complemento. En realizaciones preferidas, el ARN subgenómico se produce a partir de un constructo de vector de alfavirus, replicón de vector de ARN, o un constructo auxiliar defectuoso y codifica una o más proteínas estructurales de alfavirus u otras secuencias heterólogas de interés. Generalmente, el ARN subgenómico se asemeja a un ARNm típico con regiones no traducidas de extremo 3' y 5' y un marco de lectura abierto que codifica la proteína.

[0044] Como se usa en el presente documento, la frase "construcción de vector" se refiere en general a cualquier conjunto que es capaz de dirigir la expresión de una secuencia de ácido nucleico o gen de interés. El constructo de vector típicamente incluye un promotor/potenciador transcripcional o elemento que define locus, u otros elementos que controlan la expresión génica por otros medios tales como corte y empalme alternativo, exportación de ARN nuclear, modificación post-traduccional de mensajero, o modificación de proteína post-transcripcional. Además, el

constructo de vector incluye típicamente una secuencia que, cuando se transcribe, está unido operativamente a la secuencia o gen de interés y actúa como una secuencia de iniciación de la traducción. El constructo de vector también puede incluir opcionalmente una señal que dirige la poliadenilación, un marcador seleccionable, así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de la traducción. Ejemplos de construcciones de

5 vectores incluyen vectores ELVIS, que comprenden el complemento de ADNc de los constructos de vector de ARN, constructos de vector de ARN a sí mismos, constructos de vector de alfavírus, constructos de vectores CMV y similares.

10 [0045] "Constructo de vector Alfavírus" se refiere a un ensamblaje que es capaz de dirigir la expresión de una secuencia o gen de interés. Tales construcciones de vectores están compuestos de una secuencia que es capaz de iniciar la transcripción de un ARN de alfavírus (también denominado como 5' elementos conservados de secuencias de nucleótidos (CSE), o, 5' *cis* secuencia de replicación), así como secuencias que, cuando se expresan, se codifican para proteínas no estructurales biológicamente activas de alfavírus (por ejemplo, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4), una secuencia de reconocimiento de la ARN polimerasa del alfavírus (también denominada como 3' CSE, o, 3' *cis* secuencia de replicación), y, opcionalmente un trato poliadenilado. Además, la construcción del vector puede incluir 15 un promotor viral subgenómico "región de unión", las secuencias de uno o más genes de proteínas estructurales o porciones de los mismos, moléculas de ácido nucleico extraño que son de un tamaño suficiente para permitir la producción de partículas similares a virus (por ejemplo, partículas de replicones), un promotor 5' que es capaz de iniciar la síntesis de ARN viral a partir de ADNc *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, dentro de una célula eucariota), una secuencia heteróloga que va a expresarse, y uno o más sitios de restricción para la inserción de secuencias 20 heterólogas.

25 [0046] "Vector replicón de ARN de alfavírus", "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*, dentro de una célula diana. Para dirigir su propia amplificación, la molécula de ARN debe codificar la enzima necesaria para catalizar la 30 amplificación del ARN (por ejemplo, proteínas no estructurales alfavírus de nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) y también contienen secuencias *cis* de ARN necesarias para la replicación que son reconocidas y utilizadas por las enzimas codificadas. Un replicón de vector de ARN alfavírus debe contener los siguientes elementos ordenados: 5' secuencias virales o celulares necesarias para la amplificación mediada por proteínas no estructurales (también 35 pueden denominarse como 5' CSE, o 5' *cis* secuencia de replicación, o 5' secuencias virales requeridas en *cis* para la replicación o secuencia 5' que es capaz de iniciar la transcripción de un alfavírus), secuencias que, cuando se expresan, se codifican para proteínas no estructurales biológicamente activas de alfavírus (por ejemplo, de nsP1, de nsP2, nsP3, nsP4), y 3' secuencias virales o celulares requeridas para la amplificación mediada por proteínas no estructurales (también pueden ser referidas como 3' CSE, o 3' secuencias virales requeridas en *cis* para la replicación, o una secuencia de reconocimiento de la ARN polimerasa de alfavírus). El replicón de vector ARN de 40 alfavírus puede contener un medio para expresar una o más secuencias heterólogas, tales como por ejemplo, un promotor subgenómico IRES o viral (por ejemplo, alfavíral) (por ejemplo, promotor de la región de unión) que puede, en ciertas realizaciones, modificarse con el fin de aumentar o reducir la transcripción viral del fragmento subgenómico o para disminuir la homología con cassetes de auxiliar defectuoso o de expresión de proteína estructural, y una o más secuencias heterólogas a expresarse. Un replicón también puede contener secuencias adicionales, por ejemplo, una o más secuencias heterólogas que codifican uno o más polipéptidos (por ejemplo, un 45 gen que codifica la proteína o gen proximal a 3') y/o un trato poliadenilado. El replicón no debería contener secuencias que se codifican para todas las proteínas estructurales de alfavírus (cápsida, E2, E1). Los ejemplos no limitantes de secuencias heterólogas que pueden ser expresadas por los vectores de replicón se describen, por ejemplo en la Patente de EE.UU. N° 6.015.686, incorporada por referencia en su totalidad en el presente documento, e incluyen por ejemplo los antígenos, linfoquinas, citoquinas, etc.

50 [0047] Una "señal de empaquetamiento" o "secuencia de empaquetamiento" se refiere a una secuencia de actuación *cis* que está involucrada en la incorporación de nucleótidos (por ejemplo, ADN genómico o de ARN) en partículas virales (viriones). Señales de empaquetamiento de muchos virus se han descrito. Véase, por ejemplo, Youil R. et al (2003) Human gene therapy 14 (10): 1017-1034; Beasley BE et al (2002) J. of Virology 76 (10): 4950-4960; Watanabe T et al (2003) J. of Virology 77 (19): 10.575-10.583.

55 [0048] "Partículas de alfavírus recombinantes" o "partícula de replicón" se refiere a una unidad estructural de tipo virión que contiene un replicón de vector un ARN de alfavírus. En general, una partícula de partículas de alfavírus o replicón recombinante comprende una o más proteínas estructurales de alfavírus, una envoltura lipídica y un replicón de ARN del vector. Preferiblemente, la partícula de alfavírus recombinante contiene una estructura de nucleocápsida que está contenida dentro de una bicapa lipídica derivada de la célula huésped, tal como una membrana plasmática, en la que están incrustadas glicoproteínas de envoltura codificadas con alfavírus. La partícula también puede 60 contener otros componentes (por ejemplo, elementos de orientación, otras proteínas estructurales virales, u otros ligandos de unión a receptores) que dirigen el tropismo de la partícula de la que se derivó el alfavírus.

65 [0049] "Casete de expresión de proteína estructural de alfavírus" se refiere a una construcción de vector que es capaz de expresión de proteínas estructurales de uno o más alfavírus. El casete de expresión de proteína estructural de alfavírus puede ser un "constructo auxiliar defectuoso" que es capaz de amplificación de ARN o la replicación y expresión de una o más proteínas de alfavírus estructural en respuesta a proteínas no estructurales alfavírus

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

[0050] Los términos "5' secuencias virales o celulares necesarias para la amplificación mediada por proteínas no estructurales" y "5' secuencias necesarias para la amplificación mediada por proteínas no estructurales" y "secuencias de amplificación" y "5' secuencias de amplificación" y "5' CSE" y "5' secuencias virales necesarias en cis para la replicación" y "secuencia 5' que es capaz de iniciar la transcripción de un alfavírus" se usan indistintamente para referirse a un elemento funcional que proporciona un sitio de reconocimiento al que se sintetiza el virus o vector derivado de virus ARN de cadena positiva. Por lo tanto, puede ser un complemento de la secuencia real contenida en el virus o vector, que corresponde al extremo 3' de la copia de ARN de cadena negativa, que está unida por el complejo de replicasa de proteína no estructural, y los factores de la célula huésped, posiblemente, adicionales, a partir del cual se inicia la transcripción del ARN de cadena positiva. Una amplia variedad de secuencias han sido utilizadas como secuencias de amplificación que incluyen, por ejemplo, regiones de alfavírus de extremo 5' no traducidas (NTR) y otras secuencias adyacentes, tales como por ejemplo secuencias de nucleótidos a través de 210, 250, 300, 350, 400, o 450. Alternativamente, por ejemplo en el caso de vectores Sindbis (SIN), nucleótidos no alfavírus 10-75 para asparagina ARNt (asp ARNt) (Schlesinger et al., patente de EE.UU. Nº 5.091.309) se han utilizado.

[0051] Tal como se utiliza aquí, el término "secuencia de amplificación 5' modificado" se refiere a una molécula de nucleótido (ARN o ADN) que comprende una secuencia de amplificación como se ha definido anteriormente, cuya estructura principal (secuencia) se ha modificado (por ejemplo, sustituciones, adiciones, delecciones) en comparación con las señales de amplificación conocidas, tales que las secuencias modificadas son defectuosas como una señal de empaquetamiento, pero retienen su funcionalidad de amplificación (replicación). Por ejemplo, las secuencias de amplificación modificadas pueden incluir homología reducida para el envasado de señales a nivel de secuencia primaria, mientras que la estructura secundaria sigue siendo la de la secuencia de amplificación inicial. Secuencias de amplificación modificadas pueden incluir además secuencias adicionales, siempre y cuando la estructura secundaria y/o capacidad de amplificación de actuación cis se mantiene.

[0052] El término "3' gen proximal" se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, que está contenida dentro de un vector replicón, Eukaryotic Layered Vector Initiation System, ARN auxiliar defectuoso o casete de expresión de proteínas estructurales, y situado dentro de una posición relativa específica a otro elemento. La posición de este gen proximal 3' debe ser determinada con respecto a la secuencia 3' necesaria para la amplificación mediada por proteínas no estructurales (definidas anteriormente), en la que el gen proximal 3' es la secuencia que codifica la proteína 5' (aguas arriba), e inmediatamente anterior a este elemento.

[0053] El término "promotor subgenómico viral" se refiere a una secuencia de origen virus que, junto con la polimerasa requerida viral y celular y otros factores, permite la transcripción de una molécula de ARN de menos de la longitud del genoma. Para un promotor subgenómico de alfavírus (alfavíral) o promotor subgenómico de región de unión de alfavírus (alfavíral), esta secuencia se deriva generalmente de la región entre los marcos de lectura abiertos de proteínas no estructurales y estructurales (ORF) y normalmente controla la transcripción del ARNm subgenómico. Típicamente, el promotor subgenómico de alfavírus consta de una secuencia central que proporciona la mayor actividad del promotor asociado, así como regiones flanqueantes (por ejemplo, promotor extendido o nativo) que mejoran aún más la actividad del promotor asociado. El promotor subgenómico puede ser un complemento de la secuencia real contenida en el virus o vector, que corresponde a la región de una copia de ARN de cadena negativa, que promueve la iniciación de la transcripción del ARNm subgenómico de cadena positiva. Por ejemplo, en el caso del prototipo de alfavírus, virus Sindbis, el promotor de la región de unión subgenómico normal típicamente comienza en aproximadamente el nucleótido número 7579 y continúa a través de al menos el número de nucleótido 7.612 (y posiblemente más allá). Como mínimo, los nucleótidos 7.579-7.602 se cree que sirven como la secuencia central necesaria para la transcripción del fragmento subgenómico.

[0054] Los términos "3' secuencias virales o celulares necesarias para la amplificación mediada por proteínas no estructurales" o "3' secuencias necesarias para la amplificación mediada por proteínas no estructurales" se usan de manera intercambiable con los términos 3' CSE, o 3' cis secuencias de replicación o secuencias virales 3' requeridas en cis para la replicación, o una secuencia de reconocimiento de la polimerasa ARN de alfavírus. Esta secuencia es un elemento funcional que proporciona un sitio de reconocimiento en el que el virus o vector derivado por virus comienza la replicación (amplificación) mediante la síntesis de la cadena de ARN negativa. Una amplia variedad de secuencias se puede utilizar para esta función. Por ejemplo, la secuencia puede incluir una región no traducida de extremo 3' de antivirus completo (NTR), tales como, por ejemplo, con SIN, que incluiría los nucleótidos 11.647 a

11.703, o una región truncada de la 3' NTR, que todavía mantiene la función como una secuencia de reconocimiento (por ejemplo, nucleótidos 11.684-11.703). Otros ejemplos de secuencias que se pueden utilizar en este contexto incluyen, pero no están limitados a, secuencias no alfavírus u otras que mantienen una capacidad funcional similar para permitir la iniciación de la síntesis de ARN de cadena negativa (por ejemplo, las secuencias descritas en George et al., (2000) J. Virol. 74: 9.776-9.785).

5 [0055] "Transformación estable" se refiere a la introducción de una molécula de ácido nucleico en una célula viva, y a largo plazo o el mantenimiento permanente de dicha molécula de ácido nucleico en células de la progenie a través de ciclos sucesivos de la división celular. La molécula de ácido nucleico se puede mantener en cualquier 10 compartimento celular, incluyendo, pero no limitado al núcleo, mitochondria, o citoplasma. En realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico se mantiene en el núcleo. El mantenimiento puede ser intracromosómico (integrado) o extracromosómico, tal como un evento episomal.

15 "Línea celular envasada por alfavírus" se refiere a una célula que contiene un casete de expresión estructural de proteína de alfavírus y que produce partículas de alfavírus recombinantes tras la introducción de un constructo de vector de alfavírus, replicón de vector ARN, sistema de iniciación de vectores en capas eucariotas (por ejemplo, la patente US. Nº 5.814.482), o una partícula de alfavírus recombinante. La célula parental puede ser de origen mamífero o no mamífero. Dentro de las realizaciones preferidas, la línea celular de empaquetamiento se transforma 20 establemente con el casete de expresión de la proteína estructural.

20 [0056] "Sistema de iniciación de vector de capas eucarióticas" se refiere a un ensamblaje que es capaz de dirigir la expresión de una secuencia o gen de interés. El sistema de iniciación de vector de capas eucarióticas debe contener un promotor 5' que es capaz de iniciar *in vivo* (es decir, dentro de una célula eucariota) la síntesis de ARN a partir de ADNc, y una secuencia de vector de ácido nucleico (por ejemplo, vector viral) que es capaz de dirigir su propia 25 replicación en una célula eucariota y también expresar una secuencia heteróloga. Preferiblemente, la secuencia de vector de ácido nucleico es una secuencia de derivado de alfavírus y se compone de 5' secuencias virales o celulares necesarias para la amplificación mediada por proteínas no estructurales (también denominadas como 5' CSE, o 5' *cis* secuencia de replicación, o 5' secuencias virales requeridas en *cis* para la replicación, o secuencia 5' que es capaz de iniciar la transcripción de un alfavírus), así como secuencias que, cuando se expresan, se codifican 30 para proteínas no estructurales biológicamente activas de alfavírus (por ejemplo, de nsP1, de nsP2, nsP3, nsP4), y 3' secuencias virales o celulares necesarias para la amplificación mediada por proteínas no estructurales (también referidas como 3' CSE o secuencias virales 3' requeridas en *cis* para la replicación, o una secuencia de reconocimiento de polimerasa ARN de alfavírus). Además, la secuencia del vector puede incluir un medio para expresar la secuencia heteróloga, tal como, por ejemplo, un promotor subgenómico viral (por ejemplo, alfavíral) (por 35 ejemplo, región de unión promotor) que puede, en ciertas realizaciones, modificarse con el fin de evitar, aumentar o reducir la transcripción viral del fragmento subgenómico o para disminuir la homología con auxiliar defectuoso o cassetes estructurales de expresión de proteína, y una o más secuencias heterólogas a expresarse. Preferiblemente, la secuencia heteróloga comprende un gen que codifica la proteína y dicho gen es el gen próximo a 3' dentro de la secuencia del vector. El sistema de iniciación de vector de capas eucarióticas puede contener también una 40 secuencia de poliadenilación, empalmar secuencias de reconocimiento, una secuencia catalítica de procesamiento de ribozima, una señal de exportación nuclear, y una secuencia de terminación de la transcripción. En ciertas realizaciones, la síntesis *in vivo* de la secuencia de ácido nucleico del vector a partir de ADNc puede estar regulada por el uso de un promotor inducible o la expresión subgenómica puede ser inducible a través del uso de reguladores tradicionales o proteínas no estructurales modificadas.

45 [0057] Un "patógeno" se refiere a cualquier organismo que se asocia con o causa la enfermedad. Por lo tanto, el término "patógeno respiratorio" se refiere a cualquier organismo patógeno que se transmite por la respiración o está asociado con o causa la enfermedad en el tracto respiratorio. Los patógenos respiratorios son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a los virus, bacterias, parásitos y hongos descritos en este documento.

50 [0058] Un "antígeno" se refiere a una molécula que contiene uno o más epítopenos (ya sea lineales, conformacionales o ambos) que estimulará el sistema inmune del huésped para dar una respuesta específica de antígeno humoral y/o celular. El término se utiliza indistintamente con el término "inmunógeno". Normalmente, un epítopo incluirá entre 55 aproximadamente 3-15, generalmente de aproximadamente 5-15 aminoácidos. Un epítopo de células B es normalmente aproximadamente 5 aminoácidos, pero puede ser tan pequeño como de 3-4 aminoácidos. Un epítopo de células T, tal como un epítopo de CTL, incluirá al menos aproximadamente 7-9 aminoácidos, y un epítopo auxiliar de células T de al menos aproximadamente 12-20 aminoácidos. Normalmente, un epítopo incluirá entre aproximadamente 7 y 15 aminoácidos, tales como, 9, 10, 12 o 15 aminoácidos. El término "antígeno" denota tanto antígenos de subunidades (es decir, antígenos que están separados y discretos a partir de un organismo entero con el que el antígeno está asociado en la naturaleza), así como, muertos, atenuados o bacterias inactivadas, virus, 60 hongos, parásitos u otros microbios, así como antígenos tumorales, incluyendo dominios extracelulares de receptores de superficie celular y partes intracelulares que pueden contener epítopenos de células T. Los anticuerpos tales como anticuerpos anti-idiotípico, o fragmentos de los mismos, y mimotopos de péptidos sintéticos, que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico, también se capturan bajo la definición de antígeno como se usa en el presente documento. Del mismo modo, un oligonucleótido o polinucleótido que expresa un antígeno o determinante antigénico *in vivo*, tal como en terapia génica y aplicaciones de inmunización de ADN, también se incluyen en la 65

definición de antígeno en el presente documento.

[0059] Los epítopos de una proteína dada se pueden identificar usando cualquier número de técnicas de mapeo de epítopos, bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols* en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse mediante, por ejemplo, síntesis simultánea de grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, los péptidos correspondientes a porciones de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras que los péptidos están todavía unidos a los soportes. Tales técnicas se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.708.871; Geysen et al. (1984) Proc. Nat'l Acad Sci. USA 81: 3998-4002; Geysen et al. (1986) Molec. Immunol 23: 709-715, todos incorporados aquí por referencia en su totalidad.

[0060] De manera similar, los epítopos conformacionales son fácilmente identificados mediante la determinación de la conformación espacial de aminoácidos tales como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols*, supra.

[0061] Para los propósitos de la presente invención, los antígenos pueden derivarse de cualquiera de varios virus conocidos, bacterias, parásitos y hongos, como se describe más completamente a continuación. El término también pretende cualquier otro antígeno para el que se desea una respuesta inmune. Además, para los propósitos de la presente invención, un "antígeno" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservadoras en la naturaleza), a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la capacidad de provocar una respuesta inmunológica, tal como se define en el presente documento. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de huéspedes que producen los antígenos.

[0062] Una "respuesta inmunológica" para un antígeno o composición es el desarrollo en un sujeto de una respuesta humoral y/o una respuesta inmune celular a un antígeno presente en la composición de interés. Para los propósitos de la presente invención, una "respuesta inmune humoral" se refiere a una respuesta inmune mediada por moléculas de anticuerpo, incluyendo (IgA) secretora o moléculas de IgG, mientras que una "respuesta inmunitaria celular" es una mediada por linfocitos T y/u otras células blancas de la sangre. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por células T citolíticas ("CTL's"). CTLs tienen especificidad para antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y expresadas en las superficies de células. 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 por células T auxiliares. Las células T auxiliares actúan para ayudar a estimular la función, y enfocar la actividad de células efectoras no específicas contra células que presentan antígenos peptídicos en asociación con moléculas MHC sobre su superficie. Una "respuesta inmune celular" también se refiere a la producción de citocinas, quimiocinas y otras de tales moléculas producidas por células T activadas y/u otras células blancas de la sangre, incluyendo aquellos derivados de CD4 + y células T CD8 +. Además, una respuesta de quimiocina puede ser inducida por diferentes células blancas de la sangre o endoteliales en respuesta a un antígeno administrado.

[0063] Una composición o vacuna que provoca una respuesta inmune celular puede servir para sensibilizar un sujeto vertebrado por la presentación de antígeno en asociación con moléculas MHC en la superficie celular. La respuesta inmune mediada por células se dirige a, o cerca de, células que presentan antígeno en su superficie. Además, los linfocitos T específicos de antígeno pueden generarse para permitir la protección futura de un huésped inmunizado.

[0064] La capacidad de un antígeno particular de estimular una respuesta inmunológica mediada por células se puede determinar mediante un número de ensayos, tales como por linfoproliferación (activación de linfocitos), ensayos de células citotóxicas CTL, o ensayando para linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado. Tales ensayos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Erickson et al., J. Immunol. (1993) 151: 4189-4199; Doe et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24: 2369-2376. Los recientes métodos de medición de la respuesta inmune mediada por células incluyen la medición de citocinas intracelulares o de secreción de citoquinas por poblaciones de células T (por ejemplo, mediante la técnica ELISPOT), o por la medición de células T específicas de epítopo (por ejemplo, por la técnica de tetrámeros) (revisado por McMichael, AJ, y O'Callaghan, CA, J. Exp Med 187 (9): 1367-1371, 1998; McHeyzer-Williams, MG, et al, Immunol Rev. 150: 5- 21, 1996; Lalvani, A., et al, J. Exp Med 186: 859-865, 1997).

[0065] Por lo tanto, una respuesta inmunológica tal como se usa en el presente documento puede ser una que estimula CTLs, y/o la producción o activación de células T auxiliares. La producción de quimiocinas y/o citocinas se puede estimular también. El antígeno de interés también puede provocar una respuesta inmune mediada por anticuerpos. Por lo tanto, una respuesta inmunológica puede incluir uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos (por ejemplo, IgA o IgG) por células B; y/o la activación de supresor, citotóxicos, o células auxiliares T y/o (* células T dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos presentes en la composición o vacuna de interés. Estas respuestas pueden servir para neutralizar la infectividad, y/o mediar complemento de anticuerpo, o la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) para proporcionar protección a un huésped

inmunizado. Tales respuestas se pueden determinar usando inmunoensayos estándar y ensayos de neutralización, bien conocidos en la técnica.

5 [0066] Una "composición inmunogénica" es una composición que comprende una molécula antigénica (o secuencia de nucleótidos que codifica una molécula antigénica) donde la administración de la composición a un sujeto da como resultado el desarrollo en el sujeto de una respuesta humoral y/o celular y/o respuesta mucosal inmune a la molécula antigénica de interés. La composición inmunogénica se puede introducir directamente en un sujeto receptor, tal como por inyección, inhalación, oral, intranasal o cualquier otra vía de administración parenteral o mucosal (por ejemplo, Intra-rectal o intra-vaginal).

10 [0067] Por "vacuna de subunidad" se quiere decir una composición de vacuna que incluye uno o más antígenos seleccionados, pero no todos los antígenos, derivados de u homólogos a, un antígeno de un patógeno de interés, tal como de un virus, bacteria, parásito u hongo. Tal composición está sustancialmente libre de células intactas de patógenos o partículas patógenas o el lisado de tales células o partículas. Por lo tanto, una "vacuna de subunidad" 15 se puede preparar a partir de polipéptidos inmunogénicos al menos parcialmente purificados (preferiblemente sustancialmente purificados) del patógeno, o análogos de los mismos. El método de obtención de un antígeno incluido en la vacuna de subunidad puede incluir por lo tanto técnicas estándar de purificación, producción recombinante, o producción sintética.

20 Construcciones y partículas de alfavirus

25 [0068] Las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento incluyen una o más construcciones de alfavirus, vectores de replicón o partículas de replicón, cada construcción o de partículas que comprenden una o más secuencias que codifican proteínas derivadas de patógenos respiratorios.

30 [0069] Varios miembros del género alfavirus se están desarrollando como vectores de expresión "replicón" para el uso de vacuna y aplicaciones terapéuticas. Vectores de replicones se pueden utilizar en cualquiera de varios formatos, incluyendo construcciones de ADN del vector, vectores de ARN de replicón, y partículas de replicones recombinantes. Tales vectores de replicones se han derivado de alfavirus que incluyen, por ejemplo, SIN (Xiong et al 1989) Science 243: 1188-1191; Dubensky et al, (1996) J. Virol 70: 508-519; Hariharan et al (1998) J. Virol 72: 950-958; Polo et al (1999) PNAS 96: 4598-4603), el virus de Semliki Forest (Liljestrom (1991) Bio/Technology 9: 1356-1361; Berglund et al. (1998) Nat. Biotech 16: 562-565), VEE (Pushko et al (1997) Virology 239: 389-401), y quimeras derivadas de múltiples alfavirus (US 6376236B1; WO 2002099035; Perri et al (2003) J. Virol. 77: 10.394-10.403).

35 [0070] En general, una partícula de replicón de alfavirus se refiere a una partícula similar a virus que contiene un vector de alfavirus autorreplicante o ácido nucleico "replicón". La partícula de replicón en sí se considera generalmente que es replicación incompetente o "defectuoso", es decir, ninguna partícula de replicón de progenie resultarán cuando una célula huésped está infectada con una partícula de replicón, porque los genes que codifican una o más proteínas estructurales necesarias para el empaquetamiento son eliminados. A lo largo de los años, 40 varios términos sinónimos incluyendo partícula recombinante viral, partícula de alfavirus recombinante, partícula de replicón de alfavirus y partícula de replicón han surgido que se utilizan para describir partículas de replicón. Sin embargo, como se usa en el presente documento, estos términos se refieren a las unidades de tipo virión que contienen un replicón de vector de ARN derivado de alfavirus. Además, estos términos pueden ser referidos colectivamente como vectores, constructos de vectores o vectores de administración de genes.

45 [0071] Un amplio cuerpo de literatura ha demostrado ahora la utilidad de vectores de replicón de alfavirus derivado (por ejemplo, ADN, ARN, partículas) para estimular respuestas inmunes, tales como en aplicaciones profilácticas y terapéuticas (véase, por ejemplo, Dubensky et al., *ibid*; Berglund et al., *ibid*; Hariharan et al., *ibid*, Pushko et al., *ibid*; Polo et al., *ibid*; Davis et al (2000) J Virol 74: 371-378; Schlesinger y Dubensky (1999) Curr Opin Biotechnol 10: 434-439; Berglund et al (1999) Vaccine 17: 497-507; Kirman et al (2003) Infect Immun 71: 575-579; Pasetti et al (2003) J. Virol 77: 5209-5217; Vajdy et al (2001) J. Inf Dis.184: 1613-1616; Perri et al (2003) J. Virol 77: 10394-10403)). La 50 presente invención contempla la derivación y el uso de vectores de replicón de alfavirus que expresa uno o más antígenos de patógenos humanos o veterinarios respiratorios (por ejemplo, virus, bacterias, hongos) como un medio para estimular la respuesta inmune específica de antígeno y proporcionar una modalidad de vacuna protectora.

55 [0072] La típica configuración "replicón" (Figura 1) de los constructos de vector de alfavirus, como se describe en más detalle más arriba y en el documento US 5.789.245, 5.843.723, 5.814.482, y 6.015.694, WO 00/61772, WO 02/99035), comprende una secuencia 5' que inicia la transcripción de alfavirus ARN, una secuencia de nucleótidos que codifica proteínas no estructurales de alfavirus, un promotor de la región de unión subgenómica viral que dirige la expresión de una secuencia heteróloga de ácido nucleico adyacente, una secuencia de reconocimiento de polimerasa de ARN y, preferiblemente, un tramo poliadénulado. Otra terminología para definir los mismos elementos también se conoce en la técnica.

60 [0073] Aunque los vectores de alfavirus, tales como los de la presente invención, se pueden usar directamente para la administración *in vivo* como ARN, o administración como ADNc basada en un plásmido (por ejemplo, Eukaryotic Layered Vector System Iniciación), a menudo, para aplicaciones *in vivo* de vacuna y terapéuticas, el vector replicón

de ARN de alfavírus o replicón ARN se envasa primero en una partícula similar a virus, que comprende proteínas estructurales de alfavírus (por ejemplo, proteína de la cápsida y glicoproteínas de la envoltura). Debido a su configuración, los replicones de vectores no expresan estas proteínas estructurales de alfavírus necesarias para el empaquetamiento en partículas de replicones de alfavírus recombinantes. Por lo tanto, para generar partículas de replicones, las proteínas estructurales se deben proporcionar en *trans* (Figura 1).

[0074] El embalaje puede llevarse a cabo mediante una variedad de métodos, incluyendo enfoques transitorios, tales como co-transfección de replicón transrito *in vitro* y ARN auxiliar defectuoso (Liljestrom, Bio/Technology 9: 1356-1361, 1991; Bredenbeek et al., J. Virol. 67: 6439-6446, 1993; Frolov et al., J. Virol. 71: 2819-2829, 1997; Pushko 10 y otros, Virology 239: 389-401, 1997; Patentes de Estados Unidos 5.789.245 y 5.842.723) o plásmido replicón basado en ADN y construcciones auxiliares defectuosas (Dubensky et al., J. Virol. 70: 508-519, 1996), así como la introducción de replicones de alfavírus en líneas celulares de empaquetamiento estables (PCL) (Polo et al., PNAS 96: 4598-4603, 1999; Patentes de Estados Unidos 5.789.245, 5.842.723, 6.015.694; WO 9738087 y WO 9918226).

[0075] Las metodologías de embalaje *trans* permiten la modificación de uno o más genes de proteínas estructurales (por ejemplo, para incorporar secuencias de variantes alfavírales, tales como mutantes atenuados de Estados Unidos 5.789.245, 5.842.723, 6.015.694), seguido de la posterior incorporación de la proteína estructural modificada en las partículas de replicones finales. Además, este tipo de envases permite la modificación global de partículas de replicón del alfavírus por un embalaje de un constructo de vector o replicón de ARN derivado de un primer alfavírus usando proteínas estructurales derivadas de un segundo alfavírus diferente de la construcción de vector (WO 20 95/07994; Polo et al., 1999, *ibid*; Gardner et al., J. Virol. 74: 11849-11857, 2000; Perri et al (2003) J. Virol. 77: 10.394-10.403)).

A. Replicons y partículas de alfavírus

[0076] Como se señaló anteriormente, las partículas de replicón como se describe en el presente documento típicamente incluyen una o más secuencias de polinucleótidos (por ejemplo, el replicón ARN). Cuando se encuentra en partículas de replicón, estos polinucleótidos están rodeados por (e interactúan con) una o más proteínas de alfavírus estructural. Los ejemplos no limitantes de secuencias de polinucleótidos y proteínas estructurales que se pueden utilizar en la práctica de la invención se describen en este documento.

A.1. Componentes de nucleótidos

[0077] Las partículas, los vectores y los replicones descritos en el presente documento típicamente incluyen una variedad de secuencias de ácido nucleico, secuencias tanto codificantes como no codificantes. Será evidente que las composiciones descritas en la presente memoria comprenden generalmente menos de un genoma de alfavírus completo (por ejemplo, contienen menos de todas las secuencias codificantes y/o no codificantes contenidas en un genoma de un alfavírus).

A.2. Componentes de polinucleótidos no codificantes

[0078] Las partículas y los replicones descritos en la presente memoria 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' necesarias para la amplificación mediada por proteínas no estructurales, un medio para expresar una secuencia de nucleótidos heteróloga, y las secuencias 3' necesarias para amplificación no estructural mediada por proteínas (Patentes de Estados Unidos 5,843,723; 6.015.694; 5.814.482; las publicaciones PCT WO 97/38087; WO 00/61772). Será evidente a partir de las enseñanzas de este documento que uno, más de uno o todas las secuencias descritas en este documento pueden ser incluidas en las partículas, los vectores y/o replicones descritos en este documento y, además, que una o más de estas secuencias pueden ser modificadas o manipuladas de otro modo para uso de acuerdo con las enseñanzas del presente documento.

[0079] Por lo tanto, los polinucleótidos descritos en el presente documento incluyen típicamente una secuencia 5' necesaria para la amplificación mediada a proteínas no estructurales. Los ejemplos no limitantes de secuencias adecuadas 5' incluyen elementos de control tales como extremo 5' nativo alfavírus, un extremo 5' de alfavírus DI no nativo, y una secuencia de ARN celular derivada (por ejemplo, elemento de ARNt) (por ejemplo, Monroe et al., PNAS 80: 3279-3283, 1983).

[0080] Las secuencias del polinucleótido también incluyen generalmente un medio para expresar una secuencia de nucleótidos heterólogos (por ejemplo, polipéptido de secuencia de codificación). Los ejemplos no limitantes de tales medios incluyen elementos de control tales como promotores y similares, por ejemplo, un promotor subgenómico de alfavírus nativo de un virus homólogo, un promotor subgenómico de alfavírus nativo de un virus heterólogo, un promotor subgenómico de núcleo alfavírus (homólogos o heterólogos), secuencias mínimas de aguas arriba o aguas abajo de promotor subgenómico de núcleo, las mutaciones/delecciones/adiciones de núcleo o promotor subgenómico nativo, un promotor subgenómico compatible no derivado de alfavírus (por ejemplo, virus vegetal), un sitio de ribosoma interno de entrada (IRES), y/o un elemento de lectura completa de ribosomal (por ejemplo, BiP).

[0081] Los ejemplos no limitantes de secuencias 3' adecuadas necesarias para la amplificación mediada por proteínas no estructurales incluyen elementos de control tales como un extremo 3' de alfavírus nativo, un extremo 3' de alfavírus DI no nativo y secuencias que contienen mutaciones, delecciones o adiciones de secuencias anteriores.

5 A.3. Secuencias de codificación

[0082] Las composiciones descritas en este documento también pueden incluir una o más secuencias que codifican varios polipéptidos de alfavírus, por ejemplo uno o más de los polipéptidos de alfavírus no estructurales (de nsP1, de nsP2, nsP3, nsP4) o estructurales (por ejemplo, cápsida, glicoproteína de la envoltura).

10 [0083] Como se describe en Strauss et al. (1984), *supra*, un genoma del SIN de tipo silvestre es 11.703 nucleótidos de longitud, exclusivo de la tapa 5' y el tracto terminal 3' poli (A). Después de la tapa 5'-terminal hay 59 nucleótidos de ácido nucleico 5' no traducidos seguido de un marco de lectura de 7539 nucleótidos que codifica los polipéptidos no estructurales y que está abierto a excepción de un solo codón de terminación ópalo. Tras 48 bases no traducidas ubicadas en la región de unión que separa las secuencias de codificación de proteínas no estructurales y estructurales, hay un marco de lectura abierto 3735 nucleótidos de longitud que codifica las proteínas estructurales. Finalmente, la región no traducida 3' es de 322 nucleótidos de largo. Las proteínas no estructurales se traducen a partir del ARN genómico como dos precursores de poliproteína. La primera incluye nsP1, nsP2 y nsP3 es 1896 aminoácidos de longitud y termina en un codón ópalo en la posición 1897. La cuarta proteína no estructural, nsP4, se produce cuando la translectura del codón ópalo produce una segunda poliproteína precursora de longitud 2513 aminoácidos, que luego se escinde después de la traducción.

25 [0084] Un genoma de alfavírus de tipo natural también incluye secuencias que codifican proteínas estructurales. En SIN, las proteínas estructurales se traducen de un mensaje subgenómico que comienza en el nucleótido 7.598, es 4106 nucleótidos de longitud (excluyendo el tracto poli (A)), y es co-terminal con el extremo 3' del ARN genómico. Al igual que las proteínas no estructurales, las proteínas estructurales también se traducen como un precursor de poliproteína que se escinde para producir una proteína de la nucleocápsida y dos glicoproteínas integrales de membrana, así como dos péptidos pequeños no presentes en el virión maduro. De este modo, los replicones, las partículas y los vectores de la presente invención pueden incluir una o más secuencias de codificación derivadas de uno o más alfavírus.

30 B. Proteínas estructurales de alfavírus

35 [0085] Las proteínas estructurales que rodean (y, en algunos casos, interactúan con) el replicón de alfavírus o componente de polinucleótido de vector pueden incluir proteínas tanto de la cápsida como de la envoltura. En la mayoría de los casos, el componente de polinucleótidos están rodeados de múltiples copias de la proteína de la cápsida, que forman las nucleocápsidas. A su vez, la nucleocápsida está rodeada preferiblemente por una envoltura lipídica que contiene la glicoproteína. Proteínas de la cápsida de alfavírus y glicoproteínas de la envoltura se describen en general en Strauss et al. (1994) *Microbiol. Rev.*, 58: 491-562. La proteína de la cápsida es la proteína N-terminal de la poliproteína estructural del alfavírus, y después del procesamiento de la poliproteína, interactúa con el ARN de alfavírus y otros monómeros de proteína de la cápsida para formar estructuras de nucleocápsida. Glicoproteínas de la envoltura de alfavírus (por ejemplo, E2, E1) sobresalen de la partícula envuelta como superficie de "picos", que están implicadas funcionalmente en la unión al receptor y la entrada en la célula diana.

45 C. Métodos de producción de partículas de replicón del alfavírus

50 [0086] Las partículas de replicones de alfavírus según la presente invención se pueden producir usando una variedad de métodos publicados. Tales métodos incluyen, por ejemplo, enfoques de embalaje transitorios, tales como la co-transfección de replicón transrito *in vitro* y uno o más ARN auxiliares defectuosos (*Liljestrom, Bio/Technology* 9: 1356-1361, 1991; *Breden-beek et al, J. Virol* 67: 6439-6446, 1993; *Frolov et al, J. Virol* 71: 2819-2829, 1997; *Pushko et al, Virology* 239: 389-401, 1997; Patentes de Estados Unidos 5.789.245 y 5.842.723) o replicón basado en el ADN plásmido y constructos auxiliares defectuosos (*Dubensky et al, J. Virol* 70: 508-519, 1996), así como la introducción de replicones de alfavírus en líneas celulares de empaquetamiento estables (PCL) (*Polo et al., PNAS* 96: 4598-4603, 1999; Patentes de Estados Unidos 5.789.245, 5.842.723, 6.015.694, WO 97/38087, WO 99/18226, WO 00/61772, WO 00/39318, y WO 01/92552). Otros métodos de producción incluyen el uso de ARN basado en auxiliar no defectuoso o casetes de expresión de proteínas estructurales de ADN, que operativamente codifican una o más proteínas estructurales de alfavírus (Patentes de Estados Unidos 5.789.245, 5.842.723, 6.015.694, WO 97/38087, WO 99/18226, WO 00/61772, WO 00/39318, WO 01/92552, WO 2004085660A2, WO 2003023026A1).

60 [0087] En realizaciones preferidas, las líneas celulares de empaquetamiento de alfavírus estable se utilizan para la producción de partículas de replicón. La PCL puede transfectarse con ARN de replicón transrito *in vitro*, transfectada con el plásmido de replicón basado en ADN (por ejemplo, vector ELVIS), o infectado con una población de siembra de partículas de replicón, y después se incubó en condiciones y durante un tiempo suficiente para producir partículas de replicón empaquetadas en alto título en el sobrenadante del cultivo. En formas de realización particularmente preferidas, PCL se utilizan en un proceso de dos pasos, en el que como una primera etapa, una

población de siembra de partículas de replicón se produce transfectando la PCL con un replicón basado en ADN de plásmido. Una acción mucho mayor de partículas de replicón se produce entonces en la segunda etapa, al infectar un cultivo fresco de la PCL con la población de siembra. Esta infección se puede realizar usando diversas multiplicidades de infección (MOI), incluidas una MOI = 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 3, 5, o 10. Preferiblemente la infección se realiza a una MOI baja (por ejemplo, menos de 1). Partículas de replicón en títulos $>10^8$ unidades infecciosas (U/ml) pueden ser cosechadas en el tiempo a partir de PCL infectada con el cultivo patrón. Además, las partículas de replicón pueden posteriormente a pasos en cultivos aún mayores de PCL ingenuo por la infección de multiplicidad baja repetida, dando como resultado preparaciones a escala comercial con el mismo título alto. Es importante destacar que, mediante el uso de PCL de la configuración de genes estructural "de escisión", estas poblaciones de partículas de replicones se pueden producir libres de RCV contaminante detectable.

[0088] La producción a gran escala de partículas de replicón del alfavirus puede llevarse a cabo usando un biorreactor. Preferiblemente, el biorreactor es un biorreactor de componente externo, que es un sistema de biorreactor modular integrado para el cultivo, crecimiento y control de proceso de células adjuntas a sustrato. La unión y propagación de las células (por ejemplo, células de empaquetamiento de alfavirus) se produce en un recipiente o cámara con superficies tratadas de cultivo de tejidos, y las células están con medios frescos para aumentar la productividad celular. Seguimiento y ajustes se realizan para parámetros tales como gases, temperatura, pH, glucosa, etc., y el vector crudo se recoge usando una bomba de perfusión. Típicamente, los componentes individuales de un Biorreactor Externo separan módulos externos que están conectados (es decir, a través de los tubos). Los componentes externos pueden ser bombas, depósitos, oxigenadores, módulos de cultivo y otras partes no estándar. Un ejemplo representativo de un componente Bioreactor Externo es el sistema CellCube™ (Corning, Inc).

[0089] Además de usar el biorreactor componente externo descrito en el presente documento, un biorreactor de tanque de agitación más tradicional también se pueden utilizar, en ciertos casos, para la producción de partículas de replicón de alfavirus. En un biorreactor de tanque de agitación, las células de empaquetamiento de alfavirus pueden ser desapegadas de cualquier matriz (es decir, flotando en suspensión) o unidas a una matriz (por ejemplo, discos de polietileno, micro o macro portadores, perlas). Alternativamente, un sistema de cultivo de fibra hueca puede ser utilizado. También se pueden utilizar células adaptadas a suspensión.

[0090] Después de la cosecha, los sobrenadantes del cultivo crudo que contienen las partículas de replicones de alfavirus químéricos se pueden aclarar pasando la cosecha a través de un filtro (por ejemplo, 0,2 uM, 0,45 uM, 0,65 uM, 0,8 uM de tamaño de poro). Opcionalmente, los sobrenadantes crudos pueden ser sometidos a centrifugación a baja velocidad antes de la filtración para eliminar los restos de células grandes. En una realización, una endonucleasa (por ejemplo, Benzonasa, Sigma #E8263) se añade a la preparación de partículas de replicón del alfavirus antes o después de una etapa de purificación cromatográfica para digerir el ácido nucleico exógeno. Además, la preparación puede ser concentrada antes de la purificación usando uno de los métodos ampliamente conocidos (por ejemplo, la filtración de flujo tangencial).

[0091] Partículas de replicones de alfavirus crudas o aclaradas pueden concentrarse y purificarse mediante técnicas cromatográficas (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad). Dos o más de tales métodos de purificación pueden llevarse a cabo secuencialmente. En realizaciones preferidas, al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico se lleva a cabo y utiliza una resina de intercambio de iones, tal como una resina de intercambio iónico de tentáculo, y se lleva a cabo al menos una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño. Brevemente, filtrados de partículas esclarecidos de replicón del alfavirus se pueden cargar en una columna que contiene una matriz de intercambio iónico cargada o resina (por ejemplo, un catión o anión de cambio). La matriz o resina pueden consistir en una variedad de sustancias, incluyendo, pero no limitado a resina a base de agarosa reticulada, poliestireno reticulado, estireno reticulado, resina de poliéster hidrófila, resina acrílica, y metacrilato. El componente intercambiador de iones puede comprender, pero no está limitado a un intercambiador catiónico seleccionado de la lista que consiste en intercambiador de sulfopropilo catiónico, un intercambiador de carboximetilo de cationes, un intercambiador de ácido sulfónico, un intercambiador de cationes metilo sulfonato, y un intercambiador de SO₃⁻. En otras realizaciones, el componente de intercambiador iónico puede comprender, pero no se limita a, un intercambiador aniónico seleccionado de la lista constituida por DEAE, TMAE y DMAE. Lo más preferiblemente, cromatografía de intercambio iónico se lleva a cabo usando un intercambiador catiónico de tentáculos, en el que la resina de intercambio iónico es una resina basada en metacrilato con un intercambiador de cationes SO₃⁻ (por ejemplo, Fractogel® EDM SO₃⁻).

[0092] Las partículas de replicón pueden estar unidas a la resina de intercambio iónico, seguido de uno o más lavados con tampón que contiene una sal (por ejemplo, 250 mM o menos NaCl). Partículas de replicón a continuación se pueden eluir de la columna en forma purificada usando un tampón con una mayor concentración de sal. En realizaciones preferidas, la concentración de sal es al menos 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM o 500 mM. La elución se puede monitorizar preferiblemente mediante un espectrofotómetro a 280 nm, pero también mediante el ensayo de replicón de título, la transferencia de expresión (TOE) de ensayo, o análisis en gel de proteína con la posterior tinción con tinción de Coomassie o transferencia Western.

[0093] El tampón de elución de mayor sal posteriormente puede ser intercambiado por un tampón más deseable, por ejemplo, por dilución en la solución acuosa apropiada o pasando el eluido que contiene partículas por una columna de exclusión molecular. Adicionalmente, el uso de una columna de exclusión por tamaño molecular puede

5 también proporcionar, en ciertos casos, aún más purificación. Por ejemplo, en una realización Sephadex S-500 o la cromatografía S-400 (Pharmacia) se puede usar tanto como un intercambio de tampón, así como para purificar más las fracciones que contienen las partículas de replicón eluidas de una columna de intercambio de iones. Usando esta resina particular, las partículas de replicón generalmente se eluyen en el último volumen de huecos y muestran mejora en el nivel de pureza ya que algunos de los contaminantes son más pequeños en peso molecular y quedan retenidos en la columna más larga. Sin embargo, las resinas alternativas de diferentes composiciones así como de

10 exclusión por tamaño también se podrían utilizar que podrían producir resultados similares o mejorados. En estas estrategias, resinas de mayor tamaño, tales como Sephadex S-1000 se podrían incorporar que permitiría a las partículas de replicón entrar en la matriz y por lo tanto retenerse más tiempo, permitiendo el fraccionamiento.

[0094] Un experto en la técnica entenderá fácilmente que la introducción de ARN replicón en células permisivas se 15 puede realizar mediante una variedad de medios, tales como por ejemplo, la transfección o la electroporación de ARN (por ejemplo, ARN transcripto in vitro), la transcripción de ARN dentro de la célula a partir de ADN (por ejemplo, sistema eucariota de iniciación en capas vector), o la administración por las partículas virales o similares a virus (por ejemplo, partículas de replicones) y la introducción de ARN auxiliar defectuoso o ARNm que codifica una o más 20 proteínas estructurales de alfavirus en células permisivas también se puede realizar por una variedad de medios, tales como por ejemplo, la transfección o la electroporación de ARN (por ejemplo, ARN transcripto in vitro) o la transcripción de ARN dentro de la célula a partir de ADN (por ejemplo, casete de expresión de proteína estructural).

D. Virus inactivados

[0095] La invención incluye composiciones que comprenden virus y métodos inactivados (o muertos) para la 25 producción de los mismos. Composiciones virales inactivadas se pueden utilizar como una vacuna profiláctica. Preferiblemente, la composición de vacuna de virus inactivado comprende una cantidad de virus inactivado que es equivalente a un título de virus de aproximadamente 4 a 8 registros de unidades formadoras de placa (PFU) o de 4 a 8 logs de cultivo de tejidos de dosis infecciosa 50 (TCID₅₀) por mililitro. Todavía más preferiblemente la composición 30 de vacuna de virus inactivado comprende una cantidad de virus inactivado que es equivalente a un título de virus de aproximadamente 5 a 9 registros de unidades formadoras de placa (PFU) o de 5 a 9 logs de cultivo de tejidos de dosis infecciosa 50 (TCID₅₀) por mililitro. La composición de vacuna comprende una cantidad suficiente del antígeno del virus para producir una respuesta inmunológica en un primate.

[0096] Los métodos de inactivar o matar virus son conocidos en la técnica para destruir la capacidad de los virus 35 para infectar células de mamífero. Tales métodos incluyen medios químicos o físicos. Los medios químicos para la inactivación de un virus (por ejemplo, PIV), incluyen el tratamiento del virus con una cantidad eficaz de uno o más de los siguientes agentes: detergentes, formaldehído, formalina, β-propiolactona, o luz UV. Medios químicos adicionales para la inactivación incluyen el tratamiento con azul de metileno, psoraleno, carboxifulereno (C60) o una 40 combinación de cualquiera de los mismos. Otros métodos de inactivación viral se conocen en la técnica, tal como por ejemplo etilamina binaria, etilenimina de acetilo, o irradiación gamma.

[0097] Por ejemplo, β-propiolactona puede unirse en concentraciones tales como 0,01 a 0,5%, preferiblemente al 45 0,5% a 0,2%, y todavía más preferiblemente 0,025 a 0,1%. El agente inactivador se añade a virus que contiene sobrenadantes de cultivo (material virus) antes de o después de cosechar dichos sobrenadantes de cultivo de los recipientes utilizados para la propagación de virus, ya sea con o sin una etapa de rotura celular para la liberación de virus asociado a células antes de la recolección. Además, el agente inactivante puede ser añadido después de dichos sobrenadantes de cultivo se han almacenado congelado y descongelado, o después de una o más etapas de purificación para eliminar los contaminantes celulares. β-propiolactona se añade al material de virus, con el cambio 50 adverso en el pH a acidez controlándose con hidróxido de sodio (por ejemplo, 1 N NaOH) o solución de bicarbonato de sodio. Los inactivantes materiales de agente-virus combinados se incuban a temperaturas de 4°C a 37°C, durante tiempos de incubación de preferiblemente 12 a 72 horas.

[0098] Otro inactivante que puede unirse es etilenimina binaria. Volúmenes iguales de una solución de hidrobromuro 55 de 0,2 bromoetilamina molar y una solución de hidróxido de sodio 0,4 molar se mezclan y se incuban a aproximadamente 37°C durante 60 minutos. El inactivante ciclado resultante es etilenimina binaria, que se añade a los materiales de virus de 0,5 a 4 por ciento, y con preferencia en 1 a 3 por ciento, volumen a volumen. Los materiales inactivantes de virus se llevan a cabo de aproximadamente 4°C a 37°C durante 24 a 72 horas con agitación periódica. Al final de esta incubación de 20 ml. de una solución de tiosulfato de sodio 1 molar estéril se añade para asegurar la neutralización de la BEI.

[0099] En una realización, la invención incluye un método de inactivación que está diseñado para maximizar la exposición del virus al agente de inactivación y para minimizar la exposición a largo plazo de partículas de virus sensibles a la temperatura a temperaturas elevadas. La invención incluye un procedimiento de inactivación que 65 comprende la exposición del virus al agente de inactivación (como BPL) por 12 a 24 horas a temperaturas de refrigeración seguido de hidrólisis de cualquier agente de inactivación residual mediante la elevación de la

temperatura durante sólo 3 horas. Preferiblemente, las temperaturas de refrigeración están entre 0 y 8°C, más preferiblemente alrededor de 4°C. Preferiblemente, la temperatura elevada está entre 33 y 41°C, más preferiblemente alrededor de 37°C.

5 [0100] Se añaden las muestras diluidas y sin diluir de los materiales de virus inactivados para cultivo celular susceptible (tejido) (por ejemplo, LLC-MK2, VERO) para detectar cualquier virus no inactivado. Las células cultivadas se someten a pasadas varias veces y se examinaron para la presencia de virus basada en cualquiera de una variedad de métodos, tales como, por ejemplo, efecto citopático (CPE) y la detección de antígeno (por ejemplo, a través de conjugados de anticuerpos fluorescentes específicos para el virus). Estas pruebas permiten la determinación de la inactivación completa del virus.

10 [0101] Los virus para la inactivación o los vectores de alfavirus serán típicamente cultivados o propagados en un cultivo de células de mamífero. El cultivo de células puede ser células de crecimiento adherente o células de crecimiento en suspensión. Preferiblemente las células son de origen mamífero, pero también se pueden derivar de fuentes aviares (por ejemplo, células de gallina tales como células embrionarias de gallina (células CEF), células EB45), de anfibios, de reptiles, de insectos, o de pescado. Fuentes de mamíferos de células incluyen, pero no se limitan a células humanas o de primate no humano (por ejemplo, MRC-5 (ATCC CCL-171), (ATCC (293 células CCL-75), células de riñón embrionario humanas WI-38, típicamente transformadas por cizallado adenovirus tipo 5 ADN), PER.C6, células LLC-MK2, células VERO de riñones de mono), caballo, vaca (por ejemplo, células MDBK), ovejas, perro (por ejemplo, las células MDCK de riñón de perro, ATCC CCL34 MDCK (NBL2) o MDCK 33016, número de depósito DSM ACC 2219 como se describe en el documento WO 97/37001), cat, y roedores (por ejemplo, células de hámster como BHK21-F, las células HKCC, o células de ovario de hámster chino (células CHO)), y se pueden obtener de una amplia variedad de etapas de desarrollo, incluyendo por ejemplo, de adulto, neonatal, fetal, y el embrión. Preferiblemente, los virus de la invención se cultivan en LLC-MK2, células VERO o células de riñón de rhesus fetal.

20 [0102] Las condiciones de cultivo para los tipos de células anteriores están bien descritos en una variedad de publicaciones, o alternativamente el medio de cultivo, suplementos, y las condiciones pueden adquirirse comercialmente, tal como, por ejemplo, como se describe en el catálogo y literatura adicional de Cambrex Bioproducts (East Rutherford, NJ). En ciertas realizaciones, las células huésped utilizadas en los métodos descritos en el presente documento se cultivan en medio libre de suero libre y/o de proteínas. Un medio se conoce como un medio libre de suero en el contexto de la presente invención en la que no hay aditivos de suero de origen humano o animal. Proteína libre se entiende que significa cultivos en los que la multiplicación de las células se produce con exclusión de proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos de proteínas y proteínas no séricas. Las células que crecen en tales cultivos contienen proteínas naturales propias. Medios libres de suero conocidos incluyen medio de Iscove, medio Ultra-CHO (BioWhittaker) o EX-CELL (JRH Bioscience). Medios que contienen suero ordinario incluyen medio basal de Eagle (BME) o Medio Esencial Mínimo (MEM) (Eagle, Science, 130, 432 (1959)) o de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM o EDM), que se utilizan normalmente con hasta 10% de suero de ternero fetal o aditivos similares. Opcionalmente, el medio esencial mínimo (MEM) (Eagle, Science, 130, 432 (1959)) o de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM o EDM) puede unirse sin ningún suplemento que contiene suero. Medios libres de proteínas como PF-CHO (JHR Bioscience), medios químicamente definidos como ProCHO 4CDM (BioWhittaker) o SMIF 7 (Gibco/BRL Life Technologies) y péptidos mitogénicos como Primactona, Pepticasa o HyPep™ (todos de Quest International) o hidrolizado de lactoalbúmina (Gibco y otros fabricantes) son conocidos también adecuadamente en la técnica anterior. Los aditivos de medios basados en hidrolizados vegetales tienen la ventaja especial de que la contaminación con virus, micoplasmas o agentes infecciosos desconocidos se pueden descartar.

30 [0103] Las condiciones de cultivo celular que se utilizarán para la aplicación deseada (temperatura, densidad celular, el valor pH, etc.) son variables sobre una gama muy amplia debido a la idoneidad de la línea celular empleada de acuerdo con la invención y pueden adaptarse a los requisitos del virus o vector de propagación.

35 [0104] Los métodos de purificación de virus inactivados son conocidos en la técnica y pueden incluir uno o más de, por ejemplo, centrifugación en gradiente, ultracentrifugación, ultracentrifugación de flujo continuo y cromatografía, tal como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, y cromatografía de afinidad líquida. Véase JP Gregersen "Herstellung von Virussimpfstoffen aus Zellkulturen" Capítulo 4,2 in Pharmazeutische Biotechnologie (eds. O. Kayser y RH Mueller) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2000. Véase también, O'Neil et al., "Virus Harvesting and Affinity Based Liquid Chromatography. A Method for Virus Concentration and Purification", Biotechnology (1993) 11: 173 - 177; Prior et al, "Process Development for Manufacture of Inactivated HIV-1", Pharmaceutical Technology (1995) 30 - 52; y Majhdi et al, "Isolation and Characterization of a Coronavirus from Elk Calves with diarrhea" Journal of Clinical Microbiology (1995) 35 (11): 2937-2942.

40 [0105] Otros ejemplos de procedimientos de purificación adecuados para el uso en la invención incluyen polietilenglicol o precipitación con sulfato de amonio (véase Trepanier et al., "Concentration of human respiratory syncytial virus using ammonium sulfate, polyethylene glycol or hollow fiber ultrafiltration" Journal of Virological Methods (1981) 3(4): 201-211; Hagen et al, "Optimization of Poly(ethylene glycol) Precipitation of Hepatitis Virus Used to prepare VAQTA, a Highly Purified Inactivated Vaccine" Biotechnology Progress (1996) 12: 406 - 412; y Carlsson et al, "Purification of Infectious Pancreatic Necrosis Virus by Anion Exchange Chromatography Increases

the Specific Infectivity" Journal of Virological Methods (1994) 47:27 - 36), así como la ultrafiltración y microfiltración (véase Pay et al., Developments in Biological Standardization (1985). 60: 171-174; Tsurumi et al, "Structure and filtration performances of improved cuprammonium regenerated cellulose hollow fiber (improved BMM hollow fiber) for virus removal" Polymer Journal (1990) 22 (12): 1085-1100; y Makino et al, "Concentration of live retrovirus with a regenerated cellulose hollow fiber, BMM", Archives of Virology (1994) 139 (1-2): 87 - 96.).

5 [0106] Preferiblemente, el virus se purifica usando cromatografía, tal como cromatografía de intercambio iónico. La purificación cromática permite la producción de grandes volúmenes de suspensión que contiene virus. El producto viral de interés puede interactuar con el medio cromático mediante un simple mecanismo de adsorción/desorción, y grandes volúmenes de muestra pueden ser procesados en una sola carga. Los contaminantes que no tienen afinidad por el adsorbente pasan a través de la columna. El material de virus luego se puede eluir en forma concentrada.

10 [0107] Resinas de intercambio aniónico preferidas para su uso en la invención incluyen DEAE, EMD TMAE. Resinas de intercambio catiónico preferidas pueden comprender una superficie modificada con ácido sulfónico. En una realización, el virus se purifica usando cromatografía de intercambio iónico que comprende una resina de intercambio aniónico fuerte (es decir, EMD TMAE) para el primer paso y EMD-SO₃ (resina de intercambio catiónico) para el segundo paso. Una etapa de cromatografía de afinidad de unión a metal puede incluirse opcionalmente para una purificación adicional. (Véase, por ejemplo, WO 97/06243).

15 [0108] Una resina preferida para uso en la invención es Fractogel® EMD. Esta resina basada en metacrilato sintético tiene cadenas largas, lineales de polímeros (los denominados "tentáculos") unidos covalentemente. Esta "química de tentáculo" permite una gran cantidad de ligandos estéricamente accesibles para la unión de biomoléculas sin ningún impedimento estérico. Esta resina también tiene estabilidad de la presión mejorada.

20 [0109] Cromatografía de afinidad líquida a base de la columna es otro método de purificación preferido para uso en la invención. Un ejemplo de una resina para su uso en este método de purificación es Matrix® Cellufine™ Sulfate (MCS). MCS consiste en una matriz de celulosa esférica rígida (aprox. 45 - 105 µm de diámetro) de límite de exclusión de 3.000 Dalton (su estructura de poro excluye macromoléculas), con una baja concentración de 25 funcionalidad de éster sulfato en la posición 6 de la celulosa. Cuando el ligando funcional (éster de sulfato) es relativamente altamente disperso, presenta insuficiente densidad de carga catiónica para permitir que la mayoría de las proteínas solubles se adsorba sobre la superficie de la perla. Por lo tanto la mayor parte de la proteína que se 30 encuentra en los depósitos típicos de virus (sobrenadantes de cultivo celular, es decir, pirógenos y la mayoría de las proteínas contaminantes, así como ácidos nucleicos y endotoxinas) se lavan de la columna y se consigue un grado de purificación del virus unido.

35 [0110] Los métodos de purificación adicionales que se pueden usar para purificar virus inactivado incluyen el uso de 40 un agente degradante de ácido nucleico, preferiblemente una enzima de degradación de ácido nucleico, tal como una nucleasa que tiene DNase y la actividad de RNase, o una endonucleasa, tal como de *Serratia marcescens*, disponible comercialmente como Benzonase®, adsorbedores de membrana con grupos aniónicos funcionales (por ejemplo, Sartobind®) o etapas cromatográficas adicionales con grupos funcionales aniónicos (por ejemplo, DEAE o 45 TMAE). Una ultrafiltración/diafiltración y etapa de filtración estéril final también podrían añadirse al método de purificación. Preferiblemente, la purificación incluye el tratamiento de la preparación viral con una o más enzimas degradantes de ácidos nucleicos. Estas enzimas se pueden utilizar para reducir el nivel de ácido nucleico de la célula huésped en el proceso de purificación viral. Enzimas que digieren ácido nucleico para su uso en el cultivo de 50 células son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, Benzonase®.

[0111] La preparación viral purificada de la invención está sustancialmente libre de proteínas contaminantes derivadas de las células o cultivo de células y preferiblemente comprende menos de aproximadamente 50 pg ácido 55 nucleico celular / µg antígeno del virus. Aún más preferiblemente, la preparación viral purificada comprende menos de aproximadamente 20 pg, y aún más preferiblemente, menos de aproximadamente 10 pg. Métodos de medición de los niveles de ácido nucleico de la célula huésped en una muestra viral son conocidos en la técnica. Se prefieren los métodos estandarizados aprobados o recomendados por las autoridades reguladoras, como la OMS o la FDA.

60 [0112] La invención incluye una composición de vacuna inactivada que comprende una cantidad profilácticamente eficaz de antígeno viral, preferiblemente una glicoproteína de la envuelta o un fragmento inmunogénico de la misma. El antígeno viral está presente preferiblemente en una cantidad de concentración de 0,1 a 50 µg antígeno/dosis, más preferiblemente de 0,3 a 30 µg antígeno/dosis. Aún más preferiblemente, el antígeno es de aproximadamente 15 µg/dosis.

65 [0113] En una realización, una concentración más baja de antígeno viral se usa en composiciones de vacunas inactivadas de la invención. Tales vacunas de concentración más bajas pueden comprender opcionalmente un adyuvante para estimular la respuesta inmune del huésped al antígeno. En tal "dosis baja" de vacuna, el antígeno viral está presente preferiblemente en una concentración de menos de 15 µg de antígeno/dosis, (es decir, menos de 10, 7,5, 5 o 3 µg antígeno/dosis.

[0114] Las preparaciones de vacunas inactivadas de la invención pueden comprender además un estabilizador para preservar la integridad de las proteínas inmunogénicas en la preparación viral inactivada. Los estabilizantes adecuados para su uso en vacunas son conocidos en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, tampones, azúcares, alcoholes de azúcar, y aminoácidos. La estabilización de tampones se ajustan preferiblemente a un intervalo de pH

5 fisiológico y pueden incluir tampones de fosfato, tampones Tris, TE (Tris/EDTA), TEN (Tris/NaCl/EDTA) y solución de sal de Earle. Azúcares estabilizantes pueden incluir, por ejemplo, uno o más de sacarosa, glucosa, fructosa, dextranos, dextranosulfato, y trehalosa. La estabilización de alcoholes de azúcar puede incluir, por ejemplo, xilita/xilitol, manita/manitol, sorbito/sorbitol y glicerol. Los aminoácidos adecuados para su uso en la invención incluyen, por ejemplo, L-glutamina, arginina, cisteína y lisina. Estabilizadores adicionales que pueden unirse en la invención incluyen ácido tartárico, Pluronic F 68, y Tween 80.

10 [0115] Aislados virales que pueden utilizarse para las preparaciones virales inactivadas de la invención pueden obtenerse a partir de una variedad de fuentes, tales como por ejemplo, de una muestra clínica que está purificada (por ejemplo, purificada en placa) o desde un repositorio conocido (por ejemplo, ATCC). Métodos de aislamiento viral son conocidos en la técnica.

Patógenos respiratorios

15 [0116] Las composiciones y métodos descritos en este documento así comprenden vectores de replicón del alfavirus, constructos de vectores o partículas de replicón que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas a partir de uno o más virus de la gripe. Para los propósitos de la presente invención, virtualmente cualquier polipéptido o polinucleótido de la influenza pueden ser utilizados.

20 [0117] Los antígenos se pueden derivar de cualquier virus de la gripe conocida a la que se desea una respuesta inmune. Además, para los propósitos de la presente invención, un "antígeno" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservadoras en la naturaleza), a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la capacidad de provocar una respuesta inmunológica. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de génesis mutatis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de huéspedes que producen los antígenos.

25 [0118] Los antígenos pueden ser utilizados solo o en cualquier combinación. Las combinaciones pueden incluir múltiples antígenos de los mismos virus de la gripe, múltiples antígenos de diferentes virus de la gripe o múltiples antígenos de la misma y de diferentes virus de influenza. Por lo tanto, los antígenos virales de diferentes virus de influenza pueden ser incluidos en la misma composición o se pueden administrar al mismo sujeto por separado.

30 [0119] En general se prefiere que las combinaciones de antígenos pueden utilizarse para elevar una respuesta inmune. Los ácidos nucleicos pueden codificar proteínas inmunogénicas derivadas del mismo virus de influenza, o, alternativamente, puede codificar proteínas inmunogénicas derivadas de diferentes virus de influenza.

35 [0120] Por lo tanto, las composiciones inmunogénicas y vacunas descritas en este documento están destinadas a proporcionar una protección más óptima o completa contra patógenos respiratorios, así como aumentar la anchura de la respuesta inmune protectora.

40 [0121] Los virus de influenza de acuerdo con la presente descripción pertenecen a la Orthomyxoviridae (por ejemplo, tipos de virus de influenza A, B y C, etc., como se describe en el capítulo 19 de Vaccines, 1998, eds. Plotkin y Mortimer (ISBN 0-7216- 1946-0).

A. Influenza

45 [0122] Los virus de influenza incluyen tres tipos diferentes: A, B, y C. Virus de influenza del tipo A se dividen en subtipos sobre la base de dos proteínas en la superficie del virus, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Hay 15 subtipos diferentes de HA y 9 subtipos de NA diferentes. Los virus se clasifican de acuerdo con sus proteínas de superficie. Por ejemplo, un "virus H7N2" designa un subtipo de gripe A que tiene una proteína hemaglutinina 7 y una proteína neuraminidasa 2. Las aves silvestres son el huésped natural para todos los subtipos de virus de influenza A. Influenza B y ciertos subtipos de influenza A (H1N1, H1N2 y H3N2) normalmente circulan entre los seres humanos y causan epidemias anuales de la enfermedad. Los virus de influenza de tipo C son más leves y no causan epidemias. Virus del tipo A han sido históricamente los responsables de las pandemias de influenza.

50 [0123] Los virus de influenza incluyen cepas humanas pandémicas, pandémicas emergentes y futuras pandémicas. Las características de una cepa de influenza que le otorgan el potencial para causar un brote pandémico son: (a) Contiene una nueva hemaglutinina comparada con las hemaglutininas en cepas humanas circulantes en la actualidad, es decir, una que no ha sido evidente en la población humana desde hace más de una década (por ejemplo, H2), o rara vez se ven en la población humana (por ejemplo, H5, H7 o H9, que por lo general sólo se han encontrado en las poblaciones de aves), de tal manera que la población humana será inmunológicamente ingenua a la cepa de hemaglutinina; (b) es capaz de transmitirse horizontalmente en la población humana; y (c) que es patogénica para los seres humanos.

[0124] Enfermedad de la gripe no complicada se caracteriza por la aparición brusca de los signos y síntomas constitucionales y respiratorios (por ejemplo, fiebre, mialgia, dolor de cabeza, malestar grave, tos no productiva, dolor de garganta, y rinitis). Entre niños, otitis media, náuseas y vómitos son también reportados con la enfermedad de la gripe. Enfermedad respiratoria causada por la influenza es difícil de distinguir de la enfermedad causada por otros patógenos respiratorios sobre la base de los síntomas. La enfermedad de la gripe generalmente se resuelve después de un número limitado de días para la mayoría de las personas, aunque la tos y malestar pueden persistir durante >2 semanas. Entre ciertas personas, la influenza puede exacerbar condiciones médicas subyacentes (por ejemplo, enfermedad pulmonar o cardíaca), conducir a la neumonía bacteriana secundaria o neumonía viral de la influenza primaria, o producirse como parte de una coinfección con otros patógenos virales o bacterianos. Los niños pequeños con infección de la gripe pueden tener síntomas iniciales que imitan sepsis bacteriana con fiebre alta, y ≤ 20% de los niños hospitalizados con influenza pueden tener convulsiones febriles. Infección de la gripe también se ha asociado con encefalopatía, mielitis transversa, síndrome de Reye, miositis, miocarditis, y pericarditis.

[0125] Los riesgos de complicaciones, hospitalizaciones y muertes por influenza son más altas entre las personas de edad ≥ 65 años, los niños pequeños y las personas de cualquier edad con ciertas condiciones de salud subyacentes (véase las personas en mayor riesgo de complicaciones) que entre los niños sanos de edad avanzada y adultos más jóvenes. Muertes relacionadas con la influenza pueden ser el resultado de una neumonía, así como de exacerbación de enfermedades cardiopulmonares y otras enfermedades crónicas. Los adultos mayores representan ≥ 90% de las muertes atribuidas a neumonía e influenza.

[0126] Además de los virus de la gripe que normalmente infectan a los humanos, virus de la gripe aviar que son típicamente genéticamente distinguibles de virus de la gripe que normalmente infectan a las personas y causan diferentes grados de enfermedad en aves de corral también se contemplan en la presente invención. Las aves infectadas con el virus de la gripe aviar eliminan el virus en la saliva, secreciones nasales y heces. La enfermedad se propaga cuando las aves susceptibles tienen contacto con excreciones contaminadas. Mientras que los virus de la gripe aviar A no suelen infectar a los humanos, se han descrito varios casos de infecciones humanas y brotes de gripe aviar desde 1997. Se cree que la mayoría de los casos de infección de la gripe aviar en los seres humanos han dado como resultado el contacto con aves de corral infectadas o superficies contaminadas. Un ejemplo de un virus de la gripe aviar reportado para infectar a los seres humanos es virus de la gripe H7, que circula entre las aves en todo el mundo y puede ser mortal, especialmente a las aves domésticas como pollos y otras aves de corral. En 2003, sin embargo, los Países Bajos informaron de brotes de gripe A (H7N7) en aves de corral en varias granjas. Más tarde, se informó de infecciones entre los cerdos y seres humanos. En total, se confirmó que 83 personas tienen la infección de la gripe H7N7 del virus asociado a este brote aviar. Estos casos se produjeron en su mayoría entre los trabajadores de aves de corral. El estado de Delaware también informó de un brote de gripe aviar A (H7N2) en aves de corral. Aves de corral afectadas están siendo sacrificadas y se han establecido medidas de cuarentena. Este virus H7N2 es significativamente diferente del virus H7N7. Los brotes de gripe A (H5N1) se están produciendo actualmente en las poblaciones de aves en países de Asia y en los seres humanos en Tailandia y Vietnam. Virus de la gripe aviar H5N1 han causado previamente enfermedad en seres humanos en Hong Kong en 1997 (18 casos) y en 2 personas de Hong Kong que viajaron a China en 2003. Los antígenos de gripe preferidos de la presente invención incluyen las glicoproteínas de superficie hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA).

[0127] Una variedad de subtipos de influenza son la fuente de antígenos diana contemplados por la presente invención, incluyendo, por ejemplo aquellos con una hemaglutinina H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, o H15 y neuraminidasa N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, y N9 (por ejemplo, cepas H7N7, H7N2, H5N1, H5N2, H3N2, H1N1, H2N2, H3N8). Antígenos de codificación de gen de gripe de la presente invención incluyen la hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleocápsida (NP), proteína de matriz (M₁), proteína de canal iónico (M₂), NS₁, NS₂, PB₁, PB₂, y PA (véase, por Lamb et al, 2001, Fields Virology, Knipe y Howley, eds, pp 1487-1532, Lippincott, Williams y Wilkins; Wright et al, 2001, Fields Virology, Knipe y Howley, eds., pp. 1533-1579, Lippincott, Williams y Wilkins).

[0128] Como se señaló anteriormente, una o más proteínas de la influenza (antígenos) pueden ser codificadas por una o más construcciones de alfavirus o partículas como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, descritas en este documento son composiciones que comprenden una primera construcción de alfavirus o de partículas que comprenden un antígeno contra la gripe (HA y/o NA). Alternativamente, en otras realizaciones, las composiciones inmunogénicas comprenden antígenos de la gripe múltiples (por ejemplo, HA y/o NA) (ya sea en la misma partícula o en diferentes constructos o partículas), donde los antígenos se derivan de múltiples cepas de influenza pandémica o potencialmente pandémicas. Las composiciones se utilizan para generar una respuesta inmune protectora y/o terapéutica en un sujeto contra la infección por cepas de influenza pandémica potencial y cepas de gripe interpandémicas o para proporcionar una vacuna contra la gripe "universal".

[0129] Proteínas de influenza múltiples (antígenos) pueden ser codificadas por una o más construcciones de alfavirus o partículas que codifican antígenos de la gripe múltiples (por ejemplo, HA y/o NA) (ya sea en la misma partícula o en diferentes constructos o partículas) donde se derivan los antígenos a partir de múltiples cepas de influenza pandémica o potencialmente pandémica. Las composiciones se utilizan para generar una respuesta inmune protectora y/o terapéutica en un sujeto contra la infección por cepas de influenza pandémica o potencialmente pandémica o para proporcionar una vacuna contra la gripe pandémica "universal".

- 5 [0130] De manera similar, una o más construcciones o partículas que comprenden secuencias que codifican múltiples proteínas de gripe (por ejemplo, NA y/o proteínas HA) (ya sea en la misma partícula o en diferentes construcciones o partículas) de las cepas de influenza interpandémicas se pueden generar con el fin de proporcionar composiciones inmunogénicas (por ejemplo, vacunas) que tienen un intervalo más amplio de antígenos que las vacunas tradicionales de gripe a base de huevo (que están limitados por el suministro de huevo) o para proporcionar una vacuna universal que no tendría que ser reformulada anualmente y/o ayude en la prevención del cambio antigénico.

B. Combinaciones

- 10 [0131] La composición inmunogénica comprende ácido nucleico que codifica dos o más proteínas inmunogénicas a partir de al menos un virus de la gripe. Las composiciones inmunogénicas pueden incluir cualquier combinación de las proteínas descritas en este documento.
- 15 [0132] La invención abarca ácidos nucleicos que codifican múltiples proteínas inmunogénicas que se incluyen en el mismo constructo de vector de alfavirus o partículas de replicón.

C. Líneas celulares

- 20 [0133] Los antígenos de patógenos de las vías respiratorias se pueden producir en una variedad de diferentes sistemas de expresión conocidos en la técnica; por ejemplo los utilizados con células de mamífero, células de ave, baculovirus, bacterias y levaduras. Tales sistemas de expresión típicamente utilizarán los polinucleótidos que codifican las proteínas inmunogénicas. Tales secuencias se pueden obtener utilizando técnicas estándar de biología molecular, incluyendo la traducción de las secuencias de aminoácidos enumeradas en el presente documento. Por consiguiente, la invención incluye polinucleótidos que codifican para los antígenos virales de la invención. Además, los antígenos virales de la invención pueden ser producidos (por lo menos en parte, preferiblemente en su totalidad) por medio de métodos de química sintética.

- 30 [0134] Los sistemas de expresión de células de insectos, tales como sistemas de baculovirus, son conocidos por los expertos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Summers y Smith, Boletín Texas Agricultural Experiment Station Nº 1555 (1987). Materiales y métodos para sistemas de expresión de baculovirus/células de inserto están disponibles comercialmente en forma de kit de, entre otras cosas, Invitrogen, San Diego CA. Sistemas de expresión de célula aviar también son conocidos por los expertos en la técnica y se describen en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 5.340.740; 5.656.479; 5.830.510; 6.114.168; y 6.500.668; Patente Europea Nº EP 0787180B; 35 Solicitud de Patente Europea Nº EP03291813.8; WO 03/043415; y WO 03/076601. Del mismo modo, los sistemas de expresión de células bacterianas y de mamíferos son también conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, de Yeast Genetic Engineering (Barr et al., Eds., 1989) Butterworths, Londres.

- 40 [0135] También se conoce el número A de las células huésped apropiadas para su uso con los sistemas anteriores. Por ejemplo, líneas celulares de mamífero son conocidas en la técnica e incluyen líneas celulares disponibles de la American Type Culture de Colección (ATCC), tales como, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (por ejemplo, Hep G2), células de riñón bovino Madin-Darby ("MDBK"), así como otros. Fuentes de mamíferos de células incluyen, pero no se limitan a, humano o primate no humano (por ejemplo, las células PERC.6 que se describen, por ejemplo, en el documento WO 45 01/38362 y WO 02/40665, así como se depositan bajo número de depósito ECACC 96022940), MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), células de pulmón de rhesus fetal (ATCC CL-160), células de riñón embrionarias humanas (células 293, típicamente transformadas por ADN de adenovirus cizallado tipo 5), células VERO de riñones de mono), caballo, vaca (por ejemplo, células MDBK), ovejas, perro (por ejemplo, células MDCK a partir de riñones de perro, ATCC CCL34 MDCK (NBL2) o MDCK 33016, número de depósito DSM ACC 2219 como se describe en el documento WO 97/37001), cat, y roedores (por ejemplo, células de hámster como BHK21-F, las células HKCC, o células de ovario de hámster chino (células CHO)), y se pueden obtener de una amplia variedad de etapas de desarrollo, incluyendo por ejemplo, adulto, neonatal, fetal, y embrión.

- 55 [0136] Fuentes aviares de células incluyen, pero no se limitan a, células de pollo (por ejemplo, células madre embrionarias de pollo (por ejemplo, células EBx®), fibroblastos de embriones de pollo, células germinales embrionarias de pollo)). De manera similar, los huéspedes bacterianos tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*, y *Streptococcus spp.*, encontrarán uso con los presentes constructos de expresión. Huéspedes de levadura útiles en la presente invención incluyen, entre otras cosas, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guillermondi*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*. Las células de insecto para uso con vectores de expresión de baculovirus incluyen, entre otras cosas, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda*, y *Trichoplusia ni*.

Composiciones farmacéuticas

- 65 [0137] La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las

partículas de replicones de alfavirus, vectores y/o replicones y virus inactivados como se describe en el presente documento en combinación con un vehículo, diluyente, o excipiente farmacéuticamente. La presente invención contempla que los procedimientos descritos anteriormente para vacunas de virus inactivadas también pueden ser aplícalos a vectores de alfavirus (por ejemplo, partículas de replicones). Dentro de ciertas realizaciones

5 preferidas, se añade una cantidad suficiente de tampón de formulación a las partículas de replicón purificadas para formar una suspensión acuosa. En realizaciones preferidas, el tampón de formulación comprende un sacárido y un componente tamponador 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 diluir mínimamente las partículas de replicones. La suspensión acuosa puede almacenarse, de preferencia a -70°C, o inmediatamente secarse.

10 [0138] La suspensión acuosa puede secarse por liofilización o evaporación a temperatura ambiente. Brevemente, liofilización implica las etapas de enfriar la suspensión acuosa por debajo de la temperatura de transición del gas o por debajo de la temperatura del punto eutéctico de la suspensión acuosa, y eliminar el agua de la suspensión enfriada por sublimación para formar una partícula de replicón liofilizada. Dentro de una realización, partes alícuotas del virus recombinante formulado se colocan en una Cámara Refrigerada Edwards (unidad 3 estante RC3 S) unida a un liofilizador (Supermódulo 12K). Un procedimiento de liofilización de múltiples etapas según lo descrito por Phillips et al. (*Cryobiology* 18: 414, 1981) se utiliza para liofilizar las partículas de replicones formuladas, preferiblemente desde una temperatura de -40°C a -45°C. La composición resultante contiene menos de 10% de agua en peso de las partículas de replicón liofilizadas. Una vez liofilizadas, las partículas de replicón son estables y pueden almacenarse a -20°C a 25°C, como se discute en más detalle a continuación. En el método de evaporación, el agua se elimina de la suspensión acuosa a temperatura ambiente por evaporación. En una realización, el agua se elimina mediante un proceso de secado por pulverización, en el que la suspensión acuosa se suministra en un flujo de gas precalentado, por lo general lo que se traduce en el agua que se evapora rápidamente de las gotitas de la suspensión. Una vez deshidratado, el virus recombinante es estable y puede almacenarse a -20°C a 25°C.

15 [0139] Las soluciones acuosas usadas para la formulación comprenden preferiblemente un sacárido, un componente tampón, 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 el congelamiento y también la liofilización o secado por evaporación. Aunque un sacárido preferido es la lactosa, otros sacáridos pueden ser utilizados, tal como sacarosa, manitol, glucosa, trehalosa, inositol, fructosa, maltosa o galactosa. Una concentración particularmente preferida de lactosa es del 3%-4% en peso.

20 [0140] El aditivo estructural de alto peso molecular ayuda en la prevención de la agregación de partículas durante la congelación y proporciona soporte estructural en el estado liofilizado o secado. En el contexto de la presente invención, los aditivos estructurales son considerados como "alto peso molecular" si ellos son mayores que 5.000 M.W. Un aditivo estructural de alto peso molecular preferido es albúmina de suero humano. Sin embargo, otras sustancias también se pueden usar, tales como hidroxietilo-celulosa, hidroximetilo-celulosa, dextrano, celulosa, gelatina o povidona. Una concentración particularmente preferida de albúmina de suero humano es del 0,1% en peso.

25 [0141] El componente de tamponamiento actúa para tamponar la solución manteniendo un pH relativamente constante. Una variedad de tampones puede ser utilizada, dependiendo del rango de pH deseado, preferiblemente entre 7,0 y 7,8. Los tampones adecuados incluyen tampón de fosfato y tampón de citrato. Además, es preferible que 30 la solución acuosa contiene una sal neutra que se usa para ajustar las partículas finales de replicón formulado para una concentración de sal iso-osmótica apropiada. 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 de la presente invención pueden reconstituirse usando una variedad de sustancias, pero se reconstituyen preferiblemente usando agua. En ciertos casos, las soluciones diluidas de sal que llevan la formulación 35 final a la isotonicidad también pueden ser utilizadas.

A. Adyuvantes

40 [0142] Las composiciones inmunogénicas (por ejemplo, vacunas) de la invención pueden administrarse conjuntamente con otros agentes inmunorreguladores. En particular, las composiciones incluirán normalmente un adyuvante. Los adyuvantes para su uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes indicados a continuación:

45 A. Composiciones que contienen minerales

50 [0143] Composiciones que contienen minerales adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio. La invención incluye sales minerales tales como hidróxidos (por ejemplo oxihidróxidos), fosfatos (por ejemplo, hidroxifosfatos, ortofosfatos), sulfatos, etc. (por ejemplo, véanse los capítulos 8 y 9 de *Vaccine Design...* (1995) eds. Powell y Newman. ISBN: 030644867X Plenum), o mezclas de diferentes compuestos minerales (por ejemplo. Una mezcla de un fosfato y un adyuvante de hidróxido, opcionalmente con un exceso del fosfato), con los compuestos que tienen cualquier forma adecuada (por

ejemplo gel, cristalina, amorfa, etc.), y siendo preferida la adsorción a la sal. Las composiciones que contienen minerales también pueden formularse como una partícula de sal metálica (WO00/23105).

[0144] Las sales de aluminio pueden estar incluidas en las vacunas de la invención tal que la dosis de Al³⁺ está entre 0,2 y 1,0 mg por dosis.

[0145] En una realización, el adyuvante a base de aluminio es alumbre (sulfato de aluminio y potasio (AlK (SO₄)₂)), o un derivado de alumbre, tal como el formado in situ mediante la mezcla de un antígeno en tampón fosfato con alumbre, seguido de titulación y precipitación con una base tal como hidróxido de amonio o hidróxido de sodio.

[0146] Otro adyuvante basado en aluminio para su uso con las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento es el adyuvante de hidróxido de aluminio (Al(OH)₃) o oxihidróxido de aluminio cristalino (AlOOH), que es un excelente adsorbente, que tiene un área superficial de aproximadamente 500 m²/gramo. Alternativamente, se proporciona el adyuvante de fosfato de aluminio (AlPO₄) o hidroxifosfato de aluminio, que contiene grupos de fosfato en lugar de algunos o todos los grupos de hidroxilo del adyuvante de hidróxido de aluminio. Adyuvantes de fosfato de aluminio preferidos proporcionados en este documento son amorfos y solubles en medios ácidos, básicos y neutros.

[0147] En otra realización, el adyuvante comprende tanto fosfato de aluminio como hidróxido de aluminio. En una realización más particular del mismo, el adyuvante tiene una mayor cantidad de fosfato de aluminio de hidróxido de aluminio, tales como una relación de 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 o mayor que 9: 1, en peso de fosfato de aluminio a aluminio hidróxido. Todavía más particularmente, sales de aluminio en la vacuna están presentes en 0,4 a 1,0 mg por dosis de vacuna, o 0,4 a 0,8 mg por dosis de vacuna, o de 0,5 a 0,7 mg por dosis de vacuna, o aproximadamente 0,6 mg por dosis de vacuna.

[0148] En general, el adyuvante preferido a base de aluminio, o la relación de múltiples adyuvantes basados en aluminio, tales como fosfato de aluminio a hidróxido de aluminio se selecciona mediante la optimización de la atracción electrostática entre las moléculas de tal modo que el antígeno lleva una carga opuesta como el adyuvante al pH deseado. Por ejemplo, adyuvante de fosfato de aluminio (iep = 4) adsorbe lisozima, pero no la albúmina a pH 7,4. En caso de ser albúmina el objetivo, adyuvante de hidróxido de aluminio sería seleccionado (iep 11,4). Alternativamente, el pretratamiento de hidróxido de aluminio con fosfato disminuye su punto isoeléctrico, lo que es un adyuvante preferido para los antígenos más básicos.

A. Emulsiones oleosas

[0149] Las composiciones de aceite y emulsión adecuadas para uso como adyuvantes incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 (5% de escualeno, 0,5% de Tween 80, y 0,5% de Span 85, formulados en partículas submicrométricas usando un microfluidizador). Véase el documento WO90/14837. Véase también, Podda, "The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine", Vaccine (2001) 19: 2673-2680; Frey et al, "Comparison of the safety, tolerability, and immunogenicity of a MF59-adjuvanted influenza vaccine and a non-adjuvanted influenza vaccine in non-elderly adults", Vacunas (2003) 21: 4234-4237. MF59 se utiliza como adyuvante en la vacuna de subunidad trivalente de virus de influenza FLUAD™.

[0150] Los adyuvantes particularmente preferidos para uso con las composiciones inmunogénicas descritas en el presente documento son emulsiones submicrónicas de aceite-en-agua. Emulsiones de aceite-en-agua submicrométricas preferidas para uso en esta invención son emulsiones de escualeno/agua que contienen opcionalmente diversas cantidades de MTP-PE, tales como una emulsión submicrométrica de aceite en agua que contiene 4-5% p/v escualeno, 0,25-1,0% p/v Tween 80™ (monooleato de polioxietilenosorbitan), y/o 0,25-1,0% de Span 85™ (trioleato de sorbitán), y, opcionalmente, N-acetilmuramilo-L-alanilo-D-isoglutaminilo-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmítilo-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi) etilamina (MTP-PE), por ejemplo, la emulsión submicrométrica de aceite en agua conocida como "MF59" (publicación internacional Nº WO90/14837; patentes de EE.UU. nº. 6.299.884 y 6.451.325, y Ott y otros, " MF59 -- Design and Evaluation of a Safe and Potent Adjuvant for Human Vaccines" en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (Powell, MF y Newman, MJ eds.) Plenum Press, Nueva York, 1995, pp. 277-296). MF59 contiene 4-5% p/v escualeno (por ejemplo, 4,3%), 0,25-0,5% p/v de Tween 80™, y 0,5% p/v de Span 85™ y opcionalmente contiene diversas cantidades de MTP-PE, formuladas en partículas submicrométricas usando un microfluidizador tal como el microfluidizador Modelo 110Y (Microfluidics, Newton, MA). Por ejemplo, MTP-PE puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0-500 µg/dosis, más preferiblemente de 0-250 µg/dosis y más preferiblemente, 0-100 µg/dosis. Tal como se utiliza aquí, el término "MF59-0" se refiere a la emulsión anterior submicrométrica de aceite en agua que carece de MTP-PE, mientras que el término MF59-MTP denota una formulación que contiene MTP-PE. Por ejemplo, "MF59-100" contiene 100 µg MTP-PE por dosis, y así sucesivamente. MF69, otra emulsión submicrométrica de aceite en agua para su uso en esta invención, contiene 4,3% p/v escualeno, 0,25% p/v de Tween 80™, y 0,75% p/v de Span 85™ y opcionalmente MTP-PE. Sin embargo, otra emulsión submicrométrica de aceite en agua es MF75, también conocida como SAF, que contiene 10% de escualeno, 0,4% de Tween 80™, 5% de polímero bloqueado con plurónico L121 y thr-MDP, también microfluidizado en una emulsión submicrométrica. MF75-MTP denota una formulación MF75 que incluye MTP, tal como de 100-400 µg MTP-PE por dosis.

[0151] Emulsiones submicrométricas de aceite en agua, métodos de fabricación de los mismos y agentes

inmunoestimulantes, tales como péptidos de muramilo, para su uso en las composiciones, se describen en detalle en la Publicación Internacional Nº WO90/14837 y la patente de Estados Unidos Nº. 6.299.884 y 6.451.325.

5 [0152] El adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA) también se pueden usar como adyuvantes en la invención.

B. Formulaciones de saponina

10 [0153] Las formulaciones de saponina también pueden unirse como adyuvantes. Las saponinas son un grupo heterólogo de glucósidos de esterol y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia gama de especies de plantas. Las saponinas aisladas de la corteza del árbol Molina *quillay saponaria* se han estudiado ampliamente como adyuvantes. Las saponinas también se pueden obtener comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophila paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officinalis* (raíz de jabón). Formulaciones de adyuvantes de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como ISCOM.

15 [0154] Las composiciones de saponina se han purificado usando Cromatografía de Capa Fina de Alto Rendimiento (HP-TLC) y cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC). Fracciones purificadas específicas usando estas técnicas han sido identificadas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferiblemente, la saponina es QS21. Un método de producción de QS21 se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 5.057.540. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, tal como colesterol (véase WO96/33739).

20 [0155] Las combinaciones de saponinas y colesteroles pueden utilizarse para formar partículas únicas denominadas complejas inmunoestimulantes (ISCOM). ISCOM también incluyen típicamente un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida puede utilizarse en los ISCOM. Preferiblemente, el ISCOM incluye uno o más de Quil A, QHA y QHC. ISCOM se describen adicionalmente en EP0109942, WO96/11711 y WO96/33739. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de (a) detergente adicional. Véase el documento WO00/07621.

25 [0156] Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina se puede encontrar en Barr, et al, "ISCOMs and other saponin based adjuvants", Advanced Drug Delivery Reviews (1998) 32: 247-271. Véase también Sjolander, et al, "Uptake and adjuvant activity of orally delivered saponin and ISCOM vaccines", Advanced Drug Delivery Reviews (1998) 32: 321-338.

30 C. Virosomas y partículas similares a virus (VLP)

35 [0157] Los virosomas y partículas similares a virus (VLP) también pueden unirse como adyuvantes en la invención. Estas estructuras contienen generalmente una o más proteínas de un virus opcionalmente combinado o formulado con un fosfolípido. Son generalmente no patógeno no replicantes y generalmente no contienen nada del genoma viral nativo. Las proteínas virales pueden producirse o aislarse de virus completos de forma recombinante. Estas proteínas virales adecuadas para el uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas de virus de influenza (tales como HA o NA), virus de la Hepatitis B (tales como proteínas del núcleo o de la cápsida), virus de la hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, rotavirus, virus de fiebre aftosa, retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fagos de Q β (como proteínas de recubrimiento), fago GA, fago fr, fago AP205, y Ty (como la proteína Ty retrotransposon p1). VLP se analizan más en el documento WO03/024480, WO03/024481, y Niikura et al, "Chimeric Recombinant Hepatitis E Virus-Like Particles as an Oral Vaccine Vehicle Presenting Foreign Epitopes", Virology (2002) 293: 273-280; Lenz et al, "Papillomaviruses-Like Particles Induce Acute Activation of Dendritic Cells", Journal of Immunology (2001) de 5246-5355; Pinto, et al, "Cellular Immune Responses to Human Papillomavirus (HPV)-16 L1 Healthy Volunteers Immunized with Recombinant HPV-16 L1 Virus-Like Particles", Journal of Infectious Diseases (2003) 188: 327-338; y Gerber et al, "Human Papillomavirus Virus-Like Particles Are Efficient Oral Immunogens when Coadministered with Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin Mutant R192G or CpG", Journal of Virology (2001) 75 (10): 4.752-4.760. Los virosomas se analizan más en, por ejemplo, Gluck et al, "New Technology Platforms in the Development of Vaccines for the Future", Vaccines (2002). 20: B10-B16. Virosomas de influenza reconstituidos inmunopotenciadores (IRIV) se utilizan como la subunidad de sistema de suministro de antígeno en el producto intranasal trivalente INFLEXAL™ {Mischler y Metcalfe (2002) Vaccine 20 Suppl 5: B17-23} y el producto INFLUVAC PLUS™.

40 D. Derivados bacterianos o microbianos

45 [0158] Los adyuvantes adecuados para uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como:

50 (1) *Derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS)*

55 [0159] Tales derivados incluyen lípido de monofosforilo A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). 3dMPL es una

mezcla de 3 De-O-acilado lípido de monofosforilo A con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Una forma preferida "partícula pequeña" de 3 De-O-acilado lípido de monofosforilo A se describe en EP 0 689 454. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 micras (véase el documento EP 0 689 454). Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen imitadores de lípidos monofosforilados A, tales como derivados de fosfato de glucosaminida de aminoalquilo, por ejemplo RC-529. Véase Johnson et al. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9: 2273-2278.

5 (2) *Derivados de lípido A*

10 [0160] Derivados de lípido A incluyen derivados de lípido A de *Escherichia coli* tales como OM-174. OM-174 se describe por ejemplo en Meraldi et al., "OM-174, a New Adjuvant with a Potential for Human Use, Induces a Protective Response with Administered with the Synthetic C-Terminal Fragment 242-310 from the circumsporozoite protein of Plasmodium berghei", *Vaccines* (2003) 21: 2485-2491; y Pajak, et al, "The Adjuvant OM-174 induces both the migration and maturation of murine dendritic cells in vivo", *Vacunas* (2003) 21: 836-842.

15 15 (3) *Oligonucleótidos inmunoestimuladores*

20 [0161] Los oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia que contiene una citosina no metilada seguida de guanosina y unida mediante un enlace de fosfato). ARN de doble cadena bacteriana o los oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) también se han demostrado ser inmunoestimulantes.

25 [0162] Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser de doble cadena o de cadena sencilla. Opcionalmente, la guanosina se puede reemplazar con un análogo tal como 2'-desoxi-7-deazaguanosina. Véase Kandimalla, et al, " Divergent synthetic nucleotide motif recognition pattern: design and development of potent immunomodulatory oligodeoxyribonucleotide agents with distinct cytokine induction profiles", *Nucleic Acids Research* (2003) 31 (9): 2393-2400; WO02/26757 y WO99/62923 para ejemplos de posibles sustituciones de análogos. El efecto adyuvante de oligonucleótidos CpG se analiza más en Krieg, "CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts?", *Nature Medicine* (2003) 9 (7): 831-835; McCluskie, et al, "Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA", *FEMS Immunology and Medical Microbiology* (2002). 32: 179-185; WO98/40100; Patente de Estados Unidos Nº 6.207.646; Patente de Estados Unidos Nº 6.239.116 y la Patente de Estados Unidos Nº 6.429.199.

35 [0163] La secuencia de CpG puede dirigirse a TLR9, como el motivo GTCGTT o TTCTGTT. Véase Kandimalla, et al, "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic CpG DNAs", *Biochemical Society Transactions* (2003) 31 (parte 3): 654-658. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune Th1, tal como un ODN CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, tales como CpG-B ODN. ODNs CpG-A y CpG B se discuten en Blackwell, et al., "CpG-A-Induced Monocyte IFN-gamma-Inducible Protein-10 Production is Regulated by Plasmacytoid Dendritic Cell Derived IFN-alpha", *J. Immunol.* (2003) 170 (8): 4061-4068; Krieg, "From A to Z on CpG", *TRENDS in Immunology* (2002) 23 (2): 64-65 y WO01/95935. Preferiblemente, el CpG es un CpG-A ODN.

40 45 [0164] Preferiblemente, el oligonucleótido CpG se construye de manera que el extremo 5' es accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos CpG pueden estar unidas en sus extremos 3' para formar 'inmunómeros'. Véase, por ejemplo, Kandimalla, et al, "Secondary structures in CpG oligonucleotides affect immunostimulatory activity", *BBRC* (2003) 306: 948-953; Kandimalla, et al, "Toll-like receptor 9: modulation of recognition and cytokine induction by novel synthetic GpG DNAs", *Biochemical Society Transactions* (2003) 31 (parte 3): 664-658; Bhagat et al, "CpG penta- and hexadeox- yribonucleotides as potent immunomodulatory agents" *BBRC* (2003) 300: 853-861 y el documento WO03/035836.

50 (4) *Toxinas de ribosilación de ADP y derivados desintoxicados de las mismas.*

55 [0165] Toxinas de ribosilación de ADP bacterianas y derivados desintoxicados de los mismos pueden unirse como adyuvantes en la invención. Preferiblemente, la proteína se deriva de *E. coli* (es decir, enterotoxina lásil de calor E. coli "LT"), cólera ("CT") o pertussis ("PT"). El uso de toxinas desintoxicadas de ribosilación de ADP como adyuvantes de la mucosa es descrito en el documento WO95/17211 y como adyuvantes parenterales en WO98/42375. Preferiblemente, el adyuvante es un mutante de LT destoxificado tal como LT-K63, LT-R72, y LTR192G. el uso de ADP-ribosilación de las toxinas y derivados desintoxicados de los mismos, particularmente LT-K63 y LTR72, como adyuvantes se pueden encontrar en las siguientes referencias: Beignon, et al, "The LTR72 Mutant of Heat-Labile Enterotoxin of *Escherichia coli* Enhances the Ability of Peptide Antigens to Elicit CD4+ T Cells and Secrete Gamma Interferon after Coapplication onto Bare Skin", *Infection and Immunity* (2002) 70 (6): 3012-3.019; Pizza, et al, "vac Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants", *Vaccine* (2001) 19: 2534-2541; Pizza, et al, "LTK63 and LTR72, two mucosal adjuvants ready for clinical trials" *Int J. Med Microbiol* (200.. 0)290 (4-5): 455-461; Scharton-Kersten et al, "Transcutaneous Immunization with Bacterial ADP-Ribosylating Exotoxins, Subunits and Unrelated Adjuvants", *Infection and Immunity* (2000) 68 (9): 5.306 a 5.313; Ryan et al, "Mutants of *Escherichia coli*

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

E. Bioadhesivos y mucoadhesivos

[0166] Los bioadhesivos y mucoadhesivos también pueden unirse como adyuvantes. Bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas (Singh et al (2001) J. Cont Rele 70: 267-276) o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de ácido poliacrílico, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. Quitosano y derivados del mismo también se pueden usar como adyuvantes. Véase, por ejemplo, el documento WO99/27960.

F. Micropartículas

[0167] Las micropartículas también se pueden usar como adyuvantes. Micropartículas (es decir, una partícula de ~ 100 nm a ~ 150 µm de diámetro, más preferentemente ~ 200 nm a ~ 30 µm de diámetro, y lo más preferentemente ~ 500 nm a ~ 10 µm de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un polí(a-hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicólido) son preferidos, tratados opcionalmente para tener una superficie negativa cargada (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

G. Liposomas

[0168] Ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para uso como adyuvantes se describen en la Patente de Estados Unidos Nº 6.090.406, Patente de Estados Unidos Nº 5.916.588, y EP 0 626 169.

H. Formulaciones de éter de polioxetileno y éster de polioxetileno

[0169] Los adyuvantes adecuados para su uso con las composiciones inmunogénicas descritas en la presente invención incluyen éteres de polioxetileno y ésteres de polioxetileno. El documento WO99/52549. Dichas formulaciones incluyen además tensioactivos de polioxetileno de éster de sorbitán en combinación con un octoxinol (WO01/21207), así como éteres de alquilo de polioxetileno o tensioactivos de éster en combinación con al menos un agente tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (WO01/21152).

[0170] Los éteres de polioxetileno preferidos se seleccionan del siguiente grupo: éter de polioxetilen-9-laurilo (laureth 9), éter de polioxetileno-9-esteorilo, éter de polioxetileno-8-esteorilo, éter de polioxetilen-4-laurilo, éter de polioxetileno-35-laurilo, y éter de polioxetileno-23-laurilo.

I. Polifosfaceno (PCPP)

[0171] Se describen formulaciones de PCPP, por ejemplo, en Andrianov et al, "Preparation of hydrogel microspheres by coacervation of aqueous polyphosphazene solutions", Biomaterials (1998) 19 (1-3): 109-115 y Payne et al, "Protein Release from Polyphosphazene Matrices", Adv. Drug. Delivery Review (1998) 31 (3): 185-196.

J. Péptidos de muramilo

[0172] Los ejemplos de péptidos de muramilo adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetilo-muramilo-L-treonilo-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetilo-normuramilo-L-alanilo-D-isoglutamina (nor-MDP), y N-acetilmuramilo-1-alanilo-D-isoglutaminilo-1-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoilo-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina MTP-PE).

K. Compuestos de imidazoquinolina.

[0173] Ejemplos de compuestos de imidazoquinolina adecuados de uso en adyuvantes en la invención incluyen imiquimod y sus análogos, describen adicionalmente en Stanley, "Imiquimod and the imidazoquinolines: mechanism of action and therapeutic potential" Clin Exp Dermatol (2002) 27 (7): 571 -577; Jones, "Resiquimod 3M", Curr Opin Investig Drugs (2003) 4 (2): 214-218; y la patente de Estados Unidos Nºs 4.689.338, 5.389.640, 5.268.376, 4.929.624, 5.266.575, 5.352.784, 5.494.916, 5.482.936, 5.346.905, 5.395.937, 5.238.944, y 5.525.612.

L. Compuestos de tiosamicarbazona.

[0174] Ejemplos de compuestos de tiosamicarbazona, así como métodos de formulación, fabricación, y la detección de compuestos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen los descritos en WO04/60308. Las 5 tiosamicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, tales como TNF- α .

M. Compuestos de triptantrina

10 **[0175]** Los ejemplos de compuestos de triptantrina, así como procedimientos de formulación, fabricación, y la detección de compuestos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen los descritos en WO04/64759. Los compuestos de triptantrina son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, tales como TNF- α .

15 **[0176]** La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, las siguientes composiciones de adyuvantes pueden unirse en la invención:

- (1) una saponina y una emulsión de aceite-en-agua (WO99/11241);
- 20 (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) (véase WO94/00153);
- (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo 3dMPL) + un colesterol;
- (4) una saponina (por ejemplo QS21) + 3dMPL + ILO-12 (opcionalmente + un esterol) (WO98/57659);
- (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite-en-agua (véase las solicitudes de patente europea 0835318, 0735898 y 0761231);
- 25 (6) SAF, que contiene 10% de Escualeno, 0,4% de Tween 80, 5% de polímero de bloque plurónico L121 y thr-MDP, ya sea micro fluidizado en una emulsión submicrométrica o vórtex para generar una emulsión de tamaño de partícula más grande.
- (7) Sistema adyuvante de RibiTM (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene 2% de escualeno, 0,2% de Tween 80, y uno o más componentes bacterianos de la pared celular del grupo que consiste en lípido de monofosforilo A (MPL),
- 30 dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de la pared celular (CWS), preferiblemente MPL + CWS (DetoxTM); y
- (8) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dPML).
- (9) una o más sales minerales (tales como una sal de aluminio) + un oligonucleótido inmunoestimulante (como una secuencia de nucleótidos que incluye un motivo CpG).

N. Inmunomoduladores humanos

[0177] Inmunomoduladores humanos adecuados para su uso como adyuvantes en la invención incluyen citocinas, tales como interleucinas (por ejemplo, ILO-1, ILO-2, ILO-4, ILO-5, ILO-6, ILO-7, ILO-12, etc.), interferones (por ejemplo, interferón- γ), factor estimulante de colonias de macrófagos y factor de necrosis tumoral.

40 **[0178]** Las sales de aluminio y MF59 son adyuvantes preferidos para su uso con vacunas de la gripe inyectables. Toxinas bacterianas y bioadhesivos son adyuvantes preferidos para uso con las vacunas administradas por mucosa, como las vacunas nasales.

Aplicaciones

[0179] Los replicones de alfavirus, partículas de replicón y construcciones de vectores se pueden usar para administrar una amplia variedad de secuencias de nucleótidos, incluyendo, por ejemplo, las secuencias heterólogas que codifican antígenos de patógenos respiratorios, que estimulan una respuesta inmune. Las secuencias de nucleótidos anteriores incluyen las referenciadas anteriormente, y pueden obtenerse a partir de repositorios, fácilmente clonados a partir de ARN viral u otro usando las secuencias publicadas, o se pueden sintetizar, por ejemplo, en un sintetizador de ADN de Applied Biosystems Inc. (por ejemplo, modelo de sintetizador de ADN APB 392 (Foster City, CA)).

55 **[0180]** La presente descripción también proporciona métodos para la administración de estas secuencias heterólogas seleccionadas a un mamífero de sangre caliente (por ejemplo, un mamífero tal como un humano u otro animal de sangre caliente tal como un caballo, vaca, cerdo, oveja, perro, gato, rata o ratón) para uso como una vacuna o terapéutico, que comprende la etapa de administrar a las partículas de mamífero replicón, vectores de replicón, constructos de vectores o sistemas de iniciación del vector de capas eucariotas como se describe en el presente documento, que son capaces de expresar la secuencia heteróloga seleccionada. La administración puede ser por una variedad de rutas (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal).

60 **[0181]** Hay que señalar que el método preferido para la producción de partículas de replicones del alfavirus de la presente invención debería usar técnicas conocidas en la técnica para minimizar la posibilidad de generar virus competentes para replicación contaminantes (RCV). Una de estas estrategias es el uso de auxiliares defectuosos o PCL que contienen casetes de expresión de proteínas estructurales "de escisión" (véase Patentes de EE.UU.

5.789.245; 6.242.259; 6.329.201). En este contexto, los genes de la proteína de alfavirus estructurales se segregan en constructos de expresión separados (por ejemplo, cápsida separada de glicoproteínas) tal que la recombinación para regenerar un complemento completo de proteínas estructurales expresadas es muy poco probable.

- 5 [0182] Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar más completamente la presente invención. Además, estos ejemplos proporcionan realizaciones preferidas de la invención y no pretenden limitar el alcance de la misma.

EJEMPLOS

- 10 Ejemplo 1:

Construcción de vectores de replicón del alfavirus que contienen genes que codificadores de antígeno de virus de la gripe HA, NA o NP

- 15 [0183] Las cepas de virus de la gripe A/Panama/2007/99 Resvir-17 (H3N2) (cepa de vacuna recomendada para la producción en 2000-2003) y WS/33 (H1N1) se obtuvieron del Instituto Nacional de Estándares y Controles Biológicos (NIBSC, Herfordshire, Reino Unido). ARN total fue extraído de la semilla ya sea una acción de virus o de líquido alantoideo de huevos infectados con estos virus utilizando QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania). El ARN del virus de influenza se utilizó luego como molde para la transcripción inversa del

20 siguiente modo:

[0184] 1 µl de ARN se hibridó con 20 ng de oligonucleótidos para cebarse (Tabla 1) en un volumen total de 12 µl. En primer lugar los ADN de cadena fueron sintetizados en un 20 µl de volumen usando 200 unidades de transcriptasa inversa derivada del virus de leucemia murina de Moloney sin actividad H de RNasa (Superscript II RNasa H⁻, Gibco-BRL Eggenstein, Alemania) y las condiciones de reacción recomendadas por el fabricante. Después de 60 minutos a 42°C, la mezcla de reacción se desnaturizó durante 30 minutos a 95°C. Secuencias de ADN complementaria a partir de la cepa de virus de la gripe A/HK/213/03 (H5N1) fue proporcionada amablemente por Dr. Robert Newman en NIBSC.

- 30 [0185] Las secuencias de ADN que codifican la hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) y nucleoproteína (NP) se amplificaron por separado mediante PCR a partir de 1 µl de ADNc con 60 unidades de polimerasa ADN Pwo termoestable (Roche Applied Science, Rotkreuz, Suiza) en 50-µl de las mezclas de reacción. Cada cebador de PCR 5' y 3' contiene sitios de endonucleasas de restricción artificiales para fines de clonación. Además, los cebadores 5' contienen una secuencia de Kozak canónica (GCCGCCACC, SEQ ID NO: 1) justo antes del codón de iniciación del gen para la traducción eficaz del gen de interés en células eucariotas. Después de 30 ciclos de PCR (etapa de desnaturización a 95°C durante 45 segundos, etapa de recocido a 60°C durante 45 segundos, y etapa de extensión a 72°C durante 90 segundos), el producto se incubó adicionalmente a 72°C durante 7 minutos. Posteriormente 4 µl de 100 mM MgCl₂ y 2 µl de fragmento Klenow de polimerasa de ADN *E. coli* (5 unidades/µl) se añadieron a la reacción y se incubaron a 37°C durante 15 minutos.

- 40 [0186] El ADN fue purificado con QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) para eliminar las sales y mono y oligonucleótidos no incorporados. Los fragmentos amplificados, excepto el gen de la hemaglutinina de la cepa viral pandémica (H5) se clonaron del siguiente modo. Después de la digestión de restricción con *Sal* I y *Not* I, fragmentos de ADN de tamaños esperados (1,7, 1,4 y 1,5 kb para la hemaglutinina, neuraminidasa y nucleoproteína, respectivamente) se aislaron por preparativa en electroforesis de gel de agarosa. Fragmentos de ADN recuperados se ligaron al vector pBluescript KS (digerido con *Sal* I y *Not* I) utilizando ligasa de ADN T4 y se transformaron en células competentes XL-10 de *E. coli* (Stratagene, La Jolla, CA). El fragmento ADNc H5 fue digerido con *Asc* I y *Not* I seguido por electroforesis en gel de agarosa preparativa. El fragmento purificado H5 se ligó utilizando ligasa ADN T4 a vector pBluescript KS de los cuales sitio *Sal* I había sido convertido a un sitio *Asc* I y transformado a las células competentes XL-10 de *E. coli*. Varios clones de ADNc se aislaron de colonias únicas de *E. coli* para verificar que mutaciones artificiales no se habían introducido en los fragmentos de ADN amplificados.

- 55 [0187] Los genes de la gripe individuales fueron luego subclonados en un vector de replicón del alfavirus del siguiente modo (Figura 2). Los fragmentos de genes de hemaglutinina y neuraminidasa (*Sal* I - *Not* I) de Resvir-17 (H3 y N2) fueron extirpados de pBluescript y se subclonaron en los sitios *Xho* I - *Not* I de la columna de replicón virus Sindbis SINCR (Gardner et al, 2000, J. Virol. 74: 11849-11857 con el fin de subclonar los fragmentos de H3 en la columna de replicón de vector VEE/SIN, pVCRchim2.1 (Perri et al, 2003, J. Virol. 77: 10394-10403), el clon pBluescript se digirió primero con *Sal* I, romo con el fragmento Klenow, extirpado por restricción *Not* I. El fragmento H3 aislado se transfirió a pVCRchim2.1 del que el sitio *Asc* I se había convertido en romo. Para la subclonación de genes de hemaglutinina (H1), neuraminidasa (N1) y nucleoproteína (WNP) de WS/33 en el vector de pVCRchim2.1, la secuencia de reconocimiento *Sal* I en uno de los sitios de inserción se convirtió en una restricción *Asc* I por *Sal* I, llenando el extremo cohesivo con fragmento de dNTP y Klenow y ligación con enlazador *Asc* I.

- 60 [0188] Después de una extensa digestión con *Asc* I, fragmentos de ADN fueron aislados por electroforesis en gel de agarosa preparativa. Fragmentos de ADN recuperados se auto-ligaron utilizando ADN ligasa T4 y se introdujeron en células *E. coli* de XL-10. ADN plásmido de clones de *E. coli* transformados se sometieron a doble restricción *Asc* I/*Not*

I. El fragmento de H5 se purificó directamente por doble digestión *Asc I/Not I*. Los fragmentos de inserto se separaron del vector de ADN por electroforesis en gel de agarosa preparativa. Los fragmentos de ADN purificados se ligaron al vector pVCRchim2.1 (digerido con *Asc I* y *Not I*) utilizando ligasa de ADN T4. Todos los vectores pVCRchim2.1 se enlazaron con insertos transformados a células electrocompetentes *E. coli* azul XL-1 (Stratagene, La Jolla, CA).

[0189] Otros genes del virus de la gripe se pueden generar de una manera similar por un experto en la técnica, usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. Además, se debe apreciar que los constructos de vector de alfavírus análogos derivados de otros alfavírus se pueden sustituir fácilmente sin experimentación indebida.

[0190] La Tabla 1 muestra las secuencias de diferentes cebadores usados para PCR y transcripción inversa.

Tabla 1 Secuencias de transcripción inversa y cebadores de PCR

Gen diana	Nombre de cebador	Secuencia	Secuencia añadida
H3	HA3F1 (ADNc y cebador de PCR 5')	5'-GGGTCGACTG CAGCCGCCAC CATGAAGACT ATCATTGCT (SEQ ID NO:2)	<i>Sal I, Pst I, Kozak</i>
H3	HA3R1 (cebador de PCR 3')	5'-GCATGCGGCC GCATCGATT AAATGCAAAT GTTGCACCT (SEQ ID NO:3)	<i>Not I, Cla I</i>
N2	NA2F1 (ADNc y cebador de PCR 5')	5'-GGGTCGACAG ATCTGCCGCC ACCATGAATC CAAATCAA (SEQ ID NO:4)	<i>Sal I, Bgl II, Kozak</i>
N2	NA2R1 (cebador de PCR 3')	5'-GCATGCGGCC GCATCGATTAA TATAGGCATG AGATTGATG (SEQ ID NO:5)	<i>Not I, Cla I</i>
H1	HA1F1 (ADNc y el cebador de PCR 5')	5'-GGGTCGACTG CAGCCGCCAC CATGAAGGCA AAACTACT (SEQ ID NO:6)	<i>Sal I, Pst I, Kozak</i>
H1	HA1R1 (cebador de PCR 3')	5'-GCATGCGGCC GCATCGATT AGATGCATAT TCTRCA (SEQ ID NO:7)	<i>Not I, Cla I</i>
N1	NA1F1 (ADNc y el cebador de PCR 5')	5'-GGGTCGACAG ATCTGCCGCC ACCATGAATC CAAACCARA (SEQ ID NO:8)	<i>Sal I, Bgl II, Kozak</i>
N1	NA1R1 (cebador de PCR 3')	5'-GCATGCGGCC GCATCGATCT ACTTGTCAAT GSTGA (SEQ ID NO:9)	<i>Not I, Cla I</i>
WNP (NP o WS/33)	NPF1 (ADNc y el cebador de PCR 5')	5'-GGGTCGACTC TAGAGCCGCC ACCATGGCGT CYCAAGGCAC CA (SEQ ID NO:10)	<i>Sal I, Xba I, Kozak</i>
WNP (NP o WS/33)	NPR1 (cebador de PCR 3')	5'-GCATGCGGCC GCATCGATTAA ATTGTCGTAY TCYTC (SEQ ID NO:11)	<i>Not I, Cla I</i>
H5	HA5F1 (ADNc y cebador de PCR 5')	5'-GCATGGCGCG CCGTCGACGC CACCATGGAR ARAAYAGTGC TTCT (SEQ ID NO:12)	<i>Asc I, Sal I, Kozak</i>
H5	HA5R1 (cebador de PCR 3')	5'-GCATGCGGCC GCATCGATTAA AATGCARATT CTGC (SEQ ID NO:13)	<i>Not I, Cla I</i>
IRES	EMIRF2 (cebador de PCR 5')	5'-TTTGGCGCGC CATCGATGAT ATCTGATT CCACCATATT G (SEQ ID NO:14)	<i>Asc I, Cla I</i>
IRES	EMIRR2 (cebador de PCR 3')	5'-GCATGCGGCC GCGTCGACTT ATCATCGTGT TTTCAAAGG (SEQ ID NO:15)	<i>Not I, Sal I</i>

R = A o G, S = C o G, Y = C o T

5 Ejemplo 2:

Construcción de vectores de replicón del alfavirus que contienen al menos dos genes que codifican antígenos del virus de la gripe

10 [0191] Se generaron constructos de vectores de replicón adicional que contienen al menos dos genes que codifican antígenos separados dentro del mismo vector de replicón, por ejemplo, como un constructo bicistrónico (Figura 2). Específicamente, en un ejemplo representativo, la secuencia de sitio de entrada ribosomal interno (IRES) de virus de encefalomielitis (EMCV) (Dule, et al, 1992, J. Virol. 86: 6126) se utilizó para co-expresar un antígeno tanto hemaglutinina como neuraminidasa.

15 [0192] El IRES se subclonó en pBluescript con adición de sitios de clonación artificiales mediante PCR utilizando un plásmido que contiene IRES (pIRES) y cebadores indicados en la Tabla 1. El fragmento *Asc I - Cla I* que codifica fragmento de HA1 y *Sai I - No I* que codifica NA1 se subclonaron en el plásmido IRES recién construido usando los mismos sitios de restricción. Doble restricción *Asc I/Not I* produjo un fragmento de 3,6 kb, que contiene secuencias de H1, IRES y N1 en ese orden. Este fragmento se purificó con gel de agarosa preparativa y se subclonó al vector pVCRchim2.1 (digerido con *Asc I* y *No I*) de la misma manera como las otras construcciones monocistrónicas.

20 [0193] Además, un segundo promotor de región de unión subgenómica de alfavirus (por ejemplo, duplicado) se utilizó para expresar el segundo gen del virus de la gripe del siguiente modo y como se describe a continuación para los genes de PIV. Más específicamente, la anterior construcción de vector que expresa de gripe NA solo se utilizó como molde para la amplificación por PCR de un fragmento que comprende el promotor subgenómico de alfavirus y el gen de NA. Los oligonucleótidos IN-F y IN-R enumerados a continuación, se utilizaron como cebadores de la PCR en condiciones estándar.

30 IN-F
5'-ATATATATATGCGGCCGCTGGAGGGTTATTTGTGTGAC (SEQ ID NO: 16)
IN-R
5'-ATATATATATGTAGCGCGGCCGCATCGATT (SEQ ID NO: 17)

35 Los productos de PCR se purificaron, se digirieron con *Not I* y se ligaron en el vector de alfavirus que expresa HA solo, que también fue digerido con *Not I*, para generar el constructo bicistrónico HA + NA con promotores subgenómicos duplicados que proporcionan expresión de los dos genes de la gripe.

40 [0194] Además de los vectores de replicón que expresan tanto los genes de gripe HA y NA, otras combinaciones de genes de gripe pueden ser sustituidos en la presente invención, tales como, por ejemplo, HA + NP, NA + NP, HA + M, NA + M, y similares. Los genes de gripe se pueden obtener de cualquier fuente de virus de la gripe, incluyendo por ejemplo a partir de cepas predominantemente aviares (por ejemplo, H5, H7, H9) descritas anteriormente. También debe apreciarse que constructos de vector de alfavirus análogos multi-cistrónicos (por ejemplo, bicistrónicos) derivadas de otros alfavirus pueden construirse fácilmente de una manera similar por un experto en la técnica sin experimentación indebida.

45 Ejemplo 3:

Producción de partículas de replicón de alfavirus que expresan uno o más antígenos del virus de la gripe

50 [0195] Partículas de replicón de alfavirus que contienen las construcciones de replicones descritas anteriormente se preparan usando cualquier número de métodos disponibles descritos anteriormente y utilizados en el campo (por ejemplo, co-transfección ARN con ARN transrito in vitro auxiliar defectuoso, la introducción en líneas celulares de empaquetamiento).

55 [0196] En particular, el gen de virus de la influenza que contiene vectores de replicones descritos anteriormente se transcribieron in vitro y se utiliza para producir partículas de replicón como se describe en Perri et al. (2003) J. Virol. 77: 10.394-10.403). Partículas de replicón se cosecharon como sobrenadantes de cultivo celular, se clarificaron por filtración, se sometieron a cromatografía de intercambio iónico (WO0192552), se sometieron a una etapa de filtración adicional, y el material de partícula de replicón purificado se formula en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La determinación del título de partícula de replicón y la ausencia de contaminación de virus de replicación del competente se realizó usando técnicas estándar en el campo, esencialmente como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 6.015.694, 5.789.245, 5.843.723, 6.451.592; Perri et al. (2003) J. Virol. 77: 10.394-10.403); Polo et al., *Ibid*; WO0192552).

60 [0197] La expresión de antígenos después de la infección de células de cultivo se confirmó mediante inmunotinción

usando un anticuerpo específico de antígeno apropiado. Con referencia ahora a la Figura 11, se muestran los resultados de estudios de clasificación de células activadas fluorescentes llevados a cabo para determinar la expresión del antígeno tras la infección de células con partículas alphavirus que expresan uno o más antígenos de la gripe.

- [0198] La Figura 11 demuestra la expresión de antígenos tanto de gripe HA como NA de las dos configuraciones de replicón del alfavirus bicistrónicas diferentes descritas anteriormente (uno con sitio de entrada de ribosoma interno, IRES, el otro con un promotor subgenómico de alfavirus duplicado, sgp), después de la infección de células cultivadas. Otras combinaciones de antígenos de la gripe pueden ser expresadas de manera similar en una configuración bicistrónica para su uso como una composición immunogénica o vacuna, basada en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. La presente invención también contempla la combinación de dos o más partículas de replicón diferentes (por ejemplo, que expresan diferentes antígenos FLU) en una composición immunogénica o de vacuna y métodos para estimular una respuesta inmune usando tales combinaciones. Los ejemplos no limitantes de tales combinaciones incluyen, por ejemplo partículas que codifican de gripe HA + partículas que codifican de gripe NA, partículas que codifican de gripe HA + partículas que codifican de gripe NP, partículas que codifican de gripe NA + partículas que codifican de gripe NP, partículas que codifican de gripe NA + partículas que codifican de gripe M, partículas que codifican de gripe HA + NA a partir de una primera cepa + partículas que codifican de gripe HA a partir de una segunda cepa, y similares.

20 Ejemplo de Referencia 1:

Generación de vectores de replicón de alfavirus que contienen genes codificantes de antígeno HN o F de virus de parainfluenza humano

- 25 [0199] Para generar partículas de replicones de alfavirus que expresan la proteína de fusión (F) de la parainfluenza humana de virus de tipo 3 (VPI3h), el marco de lectura abierto F (nt. 4690 a nt. 5.589 de la secuencia de genoma, Nº de acceso Z11575, y Stokes, et al., 1992 Virus Res. 25 (1-2), 91-103) se sintetizó como una molécula de ADN dúplex mediante técnicas de síntesis génica comerciales estándar, la secuencia se verifica, y el gen sintetizado se clona en el vector pUC18 por GenScript Corporation.

- [0200]** Durante la síntesis, un sitio de restricción Asc I y la secuencia de consenso Kozak se añadieron justo aguas arriba del codón de iniciación ATG, y un sitio *Not* I que se añadió justo aguas abajo del codón de parada. El plásmido que contiene el gen F se digirió a continuación con Ascl y NotI y el gen F se subclonó en la columna del replicón VCR-Chim2.1, generando VCR-Chim2.1-F_{PIV3} (Fig. 3).

- 35 [0201] Las versiones truncadas de glicoproteínas de la envoltura de la presente invención también se generan en donde la totalidad o parte de la región de anclaje transmembrana (y la cola opcionalmente citoplásmica) se suprime con el fin de resultar en una forma secretada de la proteína. Por ejemplo, el gen de PIV F se modifica de tal manera que se elimina la región de anclaje a la membrana (residuos de aminoácidos 494-516). Más específicamente, un segmento del gen F en VCR-Chim2.1-F_{PIV3}, entre los sitios de restricción convenientes XbaI y NotI (región que codifica los últimos 73 residuos de aminoácidos) se sustituye con un fragmento de ADN generado por la superposición de oligonucleótidos que regeneran este fragmento con una delección de 22 residuos de aminoácidos correspondientes al ancla de transmembrana y una mutación silenciosa añadiendo un sitio de restricción conveniente (Scal) para el examen de clones. Se utilizan los siguientes oligonucleótidos:

40

TM-F1 (SEQ ID NO: 18): ctagaagaatcaaagaatggataagaaggtaaatcaaaaactagattctatggaaattggcatcaatctagacta
 TM-R1 (SEQ ID NO: 19): tagtacttaatgttagtgcttagttgtatgcattccatagaatctagtttgtatggaccttattccattctttgattctt
 TM-F2 (SEQ ID NO: 20): ctagaagaatcaaagaatggataagaaggtaaatcaaaaactagattctatggaaattggcatcaatctagacta
 TM-R2 (SEQ ID NO: 21):
 Gaccacttatttttgtatgtatggctgtatttgtatccactcgatattctctttttaattctt

- [0202]** Los oligonucleótidos se re-constituyen según la recomendación del proveedor para producir 100 nM de soluciones de cada oligo individual. Para ensamblar el fragmento, 100 pmoles de cada oligo se mezclan en un solo tubo de reacción que contiene tampón de quinasa de polinucleótido T4 (New England Biolabs, Beverly, MA), 1 mM de rATP, agua, y 10 unidades de enzima de quinasa de polinucleótido T4 (New England Biolabs, Beverly, MA) en un volumen de reacción final de 500 ul. Se deja que la reacción de fosforilación proceda durante 30 minutos a 37°C, en cuyo momento la reacción se suplementa con 10 unidades adicionales de quinasa de polinucleótido T4 y se deja continuar durante otros 30 minutos.

- 60 [0203] En la conclusión de la reacción, el tubo que contiene la mezcla se calienta a 95°C durante 5' en un vaso que contiene un gran volumen de agua para desnaturalizar la enzima y cualesquiera hebras de ADN que pueden ya haberse recocido. El vaso de precipitados se retira entonces de la fuente de calor y se deja enfriar lentamente a temperatura ambiente, a fin de que los oligonucleótidos complementarios se hibriden en hebras de ADN dúplex completas.

- [0204]** Una vez enfriado, 0,2 pmoles del material reaccionado se ligaron con 100 pmoles de VCR-Chim2.1- F_{PIV3}

ADN previamente digerido con XbaI y NotI, tratado con fosfatasa alcalina y se purificaron en gel (la banda de 12 kb). La ligación se transforma en bacterias competentes de acuerdo con los métodos y los transformantes estándar se analizan para la presencia de los sitios de enzimas de terminales apropiados, por tamaño de inserto, la evidencia de la duplicación de inserción, y la orientación. Varios transformantes positivos son entonces elegidos al azar y las secuencias confirmadas. Cualquier error de secuencia puede ser corregido por mutagénesis dirigida al sitio estándar. Una construcción de borrado tanto del dominio transmembrana como la cola citoplásmica se genera también mediante el uso de métodos estándar de PCR, los oligonucleótidos a continuación como cebadores, y VCR-Chim2.1-F_{PIV3} como molde.

10 PIVf: 5'-ATATATATATACGGCGGCCACCATGCCAAC (SEQ ID NO: 22)
 PIVr: 5'-ATATATATGCGGCCGCTTATGTAGTGCTAGATTGATGCCATTTC (SEQ ID NO: 23)

15 [0205] El producto de PCR de gen truncado F está entonces sustituido en VCR-Chim2.1-F F_{PIV3} en lugar del gen F de PIV de longitud completa utilizando técnicas estándar.

20 [0206] De manera similar a F, con el fin de generar partículas de replicones de alfavirus que expresan el antígeno VPI3h HN, el marco de lectura abierto HN (nt. 6806 a nt. 8524 de la secuencia del genoma) también se sintetizó utilizando técnicas comerciales convencionales conocidas en la técnica y clonadas en pUC18 por GenScript Corporation. En este caso, también se añadieron los sitios de restricción de Asc I y Not I y secuencias de consenso de Kozak. Este plásmido fue digerido con Asc I y Not I, y se clonó en VCR-Chim2.1 para generar VCR-Chim2.1-HN F_{PIV3} (Fig. 3). La expresión de HN se confirmó mediante la transfección de células BHK con ARN transcripto in vitro sintetizado a partir de molde VCR-Chim2.1-HN_{PIV3} usando procedimientos estándar, seguido por análisis de transferencia Western usando antisueros policlonales de PIV específico generado contra virus PIV3 inactivado.

25 [0207] También debe apreciarse que otros genes de PIV también se pueden usar y que los constructos de vector de alfavirus análogos o bicistrónicos derivados de otros alfavirus se pueden construir fácilmente de una manera similar por un experto en la técnica sin experimentación indebida. Además, genes de PIV pueden ser generados para la clonación en las columnas vertebrales de vector de alfavirus usando técnicas estándar de TA-PCR, tales como los descritos a continuación para genes de RSV.

Ejemplo de Referencia 2:

Generación de vectores de replicón del alfavirus que coexpresan tanto virus de parainfluenza humano HN como antígenos F

30 [0208] Vectores de replicón de alfavirus que co-expresan los antígenos hPIV3 HN y F pueden estar construidos de múltiples maneras (Fig. 3), por ejemplo como un constructo IRES-bicistrónico (descrito anteriormente) o como una construcción de promotor doble subgenómico (también descrito anteriormente).

40 [0209] Específicamente, el antígeno HN se expresa a partir de un primer promotor subgenómico de alfavirus y el antígeno F se expresa a partir de un segundo promotor subgenómico de alfavirus. Tal constructo se hace fácilmente mediante la clonación del gen F como un casete que ya contiene el marco abierto de lectura F y el promotor subgenómico de alfavirus de constructo VCR-Chim2.1-F_{PIV3} o VCR-Chim2.1-FdISP_{PIV3} (descrito anteriormente).

45 [0210] Estas construcciones se dirigieron con las enzimas de restricción únicas *Msc* I (situadas en -82 de inicio de transcripción) o *Swa* I (situado en -566 de inicio de transcripción), ligadas a un enlazador Not I, digeridas con Not I, purificadas en gel, y ligadas a VCR-Chim2.1-HN_{PIV3} tratadas previamente con Not I y fosfatasa alcalina. Los transformantes se criban por la presencia del inserto y la orientación correcta con digestos de restricción apropiada, como Asc I, que libera 1,7 kb (para el casete *Msc* I -*Not* I) o kb 2,2 (para el Casete *Swa* I-*Not* I). Alternativamente, las metodologías estándar de PCR, como las que se describen anteriormente, se pueden utilizar para llevar a cabo la misma construcción.

Ejemplo de Referencia 3:

55 Producción de partículas de replicón de alfavirus que expresan uno o más antígenos del virus de parainfluenza

60 [0211] partículas de replicón de alfavirus que contienen constructos de replicón descritos anteriormente se pueden preparar usando cualquier número de métodos disponibles descritos anteriormente y utilizados en el campo (por ejemplo, la co-transfección de ARN de replicón con uno o más ARN auxiliares defectuosos transcritos in vitro, la introducción del replicón en líneas celulares de envase). Por ejemplo, el vector de replicón que contiene el gen HN de virus de parainfluenza descrito en los Ejemplos 4 y 5, se transcribió in vitro y se utilizó para producir partículas de replicón como se describe en Perri et al. (2003) J. Virol. 77: 10.394-10.403.

65 [0212] Partículas de replicón se cosecharon a partir de sobrenadantes de cultivo de células, se clarificaron por filtración, se sometieron a cromatografía de intercambio iónico (WO0192552), sujeta a una etapa de filtración adicional, y el material de partícula de replicón purificado se formuló en un diluyente farmacéuticamente aceptable.

La determinación del título de partícula de replicón y la ausencia de contaminación de virus de replicación del competente se realizó usando técnicas estándar en el campo (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 6.015.694, 5.789.245, 5.843.723, 6.451.592; Perri et al (2003) J. Virol 77: 10394-10403); Polo et al., *Ibid*; WO0192552). La expresión del antígeno de PIV se confirmó mediante inmunotinción y transferencia Western con un anticuerpo apropiado después de la infección de las células cultivadas

Ejemplo de Referencia 4:

Generación de vectores de replicón de alfavirus que contienen genes codificadores de antígenos G o F de virus sincitial respiratorio

[0213] Para construir vectores de replicón de alfavirus que expresan la glicoproteína de fusión del RSV (F), el marco de lectura abierto F se genera a partir de la cepa A2 humana (nt 5661- 7382 de la secuencia del genoma, GenBank acceso# M74568; Wertz, et al. 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 82, 4075-4079), como una molécula dúplex de ADN mediante técnicas de síntesis génica comerciales estándar, la secuencia se verifica, y el gen sintetizado se clonó en el vector pUC18 por Retrogen Corporation.

[0214] Durante la síntesis, un sitio de restricción Asc I y la secuencia de consenso Kozak se añadieron justo aguas arriba del codón de iniciación ATG, y un sitio Not I que se añadió justo aguas abajo del codón de parada. El plásmido que contiene el gen F y luego se digirió con Ascl y NotI y el gen F se subclonó en la columna del replicón VCR-Chim2.1, generando VCR-Chim2.1-F_{RSV} (Figura 4).

[0215] Los vectores de replicones de alfavirus que expresan la proteína de unión G del virus respiratorio sincitial (RSV) se generan de la siguiente manera. Una codificación de la secuencia de ADNc para la proteína G se genera a partir de un aislado humano, como por ejemplo, la cepa A2 (GenBank #acceso M74568; Wertz, et al. 1985 Proc Natl Acad Sci EE.UU. 82, 4075-4079). El ADNc del gen de 900 nucleótidos (de nt. 4690 a nt. 5.589 de la secuencia del genoma) se genera por transcripción inversa de poli A de ARNm extraído de células infectadas con el RSV (extraído con triazol, BRL, seguido por Oligotex, Qiagen) usando kit de Superíndice Pre-amplificación (GIBCO-BRL) y un oligonucleótido poli-dT. A continuación, el ADNc se amplificó por la amplificación estándar de tres etapas de PCR (30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C, 1 min a 72°C), utilizando vent polimerasa (NEB) o Pfu (Stratagene) y los siguientes oligonucleótidos:

RSV-Gf: atatatatggcgccccaccatgtccaaaaacaaggaccaac (SEQ ID NO: 24)
 RSV-Gr: atatatatatgcggccctactggcgtggtgtggg (SEQ ID NO: 25)

[0216] El oligonucleótido RSV-Gf contiene el sitio de restricción conveniente Ascl seguido de la secuencia de consenso Kozak colocada aguas arriba de la ATG de partida. El oligonucleótido RSV-Gr contiene el sitio de restricción Not I. Después de la amplificación, el fragmento de ADN se purifica con QIAquick-spin (Qiagen), se digirió con Ascl y Not I y se purificó en gel. El fragmento se liga al vector de replicón ADN VCR Chim2.1 que ha sido digerido previamente con Ascl y Not I, tratado con fosfatasa alcalina de gamba, y se purificó de un gel de agarosa al 0,7%, para generar un constructo VCR-Chim2.1-G_{RSV} (Figura 4). Del mismo modo, el ADNc que codifica para la proteína F (nt. 5661- 7382 de la secuencia del genoma) se genera a partir de un aislado humano o animal (veterinario), como por ejemplo, la cepa A2, como se describe en el ejemplo anterior. El ADNc se amplificó por la amplificación estándar de tres etapas de PCR (30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C, 1 min a 72°C), utilizando polimerasa vent (NEB) o Pfu (Stratagene) y los siguientes oligonucleótidos:

RSV-Ff: atatatatggcgccccaccatggagttctaattcctaaagc (SEQ ID NO: 26)
 RSV-Fr: atatatatatgcggccgttagttactaaatgcaatatttatac (SEQ ID NO: 27)

[0217] El oligonucleótido RSV-Ff contiene el sitio de restricción conveniente Ascl seguido de la secuencia de consenso Kozak colocada justo aguas arriba del ATG de partida, y el oligonucleótido RSV-Gr contiene el sitio de restricción NotI. El fragmento amplificado se trata a continuación y se clonó en VCR-Chim2.1 como se describe en el ejemplo anterior, generando el constructo VCR-Chim2.1-F_{RSV} (Figura 4). Alternativamente, el gen G del RSV puede sintetizarse comercialmente, como se describe anteriormente para los genes de PIV.

[0218] Las versiones truncadas de glicoproteínas de la envoltura de patógenos de virus respiratorio de la presente invención (por ejemplo, RSV F) también pueden ser generadas por un experto en la técnica usando técnicas que la totalidad o parte de la región de anclaje transmembrana de biología molecular estándar (y opcionalmente cola citoplásrica) se suprime con el fin de resultar en una forma secretada de la glicoproteína. Otras modificaciones a los genes de glicoproteína de envoltura de la presente invención también se contemplan y pueden ser fácilmente sustituidos, tales como por ejemplo, delección o sustitución de las regiones no traducidas del extremo 5', la incorporación de secuencias líder heterólogas, y similares.

[0219] De una manera similar, la secuencia de RSV M 2-1 se sintetiza comercialmente con sitios Ascl y NotI flanqueantes y se clona en la columna del VCR-Chim2.1.

[0220] Los transformantes derivados de esta ligación se analizan primero para la presencia de los sitios de clonación apropiados, por tamaño de inserto, y la evidencia de la duplicación de inserción. Varios transformantes positivos se eligen al azar y se sometieron a la confirmación de la secuencia.

5 Ejemplo de Referencia 5:

Construcción de vectores de replicón del alfavirus que coexpresan tanto antígenos de virus respiratorio sincitial G como F

10 **[0221]** Los vectores de replicón de alfavirus que coexpresan los antígenos RSV tanto G como F, o F o G más un antígeno adicional (por ejemplo, M2-1), están construidos de múltiples maneras (Figura 4), tal como por ejemplo como un constructo IRES-bicistrónico (descrito anteriormente) o como una construcción de promotor doble subgenómico (también descrito anteriormente).

15 **[0222]** En un ejemplo representativo, el antígeno G se expresa a partir de un promotor subgenómico de alfavirus primero y el antígeno F se expresa a partir de un segundo promotor subgenómico de alfavirus, en el mismo vector de replicón. Esta construcción se hace fácilmente mediante la clonación de la secuencia del gen F como un casete que contiene el marco de lectura abierto F y el promotor subgenómico de alfavirus de constructo VCR-Chim2.1-F_{RSV} descrito anteriormente.

20 **[0223]** Esta construcción se digirió con las enzimas de restricción únicas *Msc* I (situadas en -82 de inicio de transcripción) o *Swa* I (situadas en -566 de inicio de transcripción), se ligó a enlazador *Not*I, se digirió con *Not*I, se purificó en gel, y se ligó a VCR-Chim2.1-G_{hRSV} previamente tratado con *Not*I y fosfatasa alcalina. Los transformantes se criban por la presencia del inserto y la orientación correcta con digestos de restricción apropiada como *Asc* I, que libera un 1 kb (para el casete *Msc* I -*Not* I) o un kb 1,5 (para el casete *Swa* I-*Not* I).

25 **[0224]** La presente invención también contempla que las construcciones de vector de alfavirus análogas o bicistrónicas derivadas de otros alfavirus se pueden construir fácilmente de una manera similar por un experto en la técnica usando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

30 Ejemplo de Referencia 6:

Producción de una vacuna inactivada PIV

35 **[0225]** La cepa de PIV3 JS se utilizó para infectar células LLC- MK2 y medios de sobrenadante recogidos a las 96 horas después de la clarificación de la infección y filtrarse a través de un filtro de 0,2 um. Se aplicaron aproximadamente 450 ml de los medios cosechados a una columna de 10 ml que contiene la resina de intercambio catiónico, Fractogel® EMD SO₃⁻ (M) (s- Fractogel®, EM Industries). La columna había sido desinfectada con 0,5 N NaOH seguido de 10 volúmenes de columna de WFI y se equilibró con 10 mM de fosfato de sodio, 125 mM de cloruro de sodio, pH 7,0.

40 **[0226]** El sobrenadante clarificado se pasó a través de la columna a una velocidad de flujo de 115 cm/hora. La columna se lavó con aproximadamente 40 volúmenes de columna de tampón de equilibrado. Una elución de un solo paso se realizó mediante la aplicación de aproximadamente 20 ml de tampón que contenía 10 mM de fosfato de sodio, 400 mM de cloruro de sodio, pH 7,0. El pico eluido como base en la absorbancia a 280 nm se diluyó a 125 mM de cloruro de sodio y 40 mg/ml de lactosa.

45 **[0227]** La inactivación del PIV3 se efectuó mediante la adición de β-propiolactona (nº de catálogo P1424, Spectrum Chemical Mfg. Corp., Gardena, CA). La solución madre de β-propiolactona se diluyó primero a 1: 200 en agua altamente purificada, a continuación, lentamente, gota a gota, se diluyó hasta una concentración de 1: 2000 directamente en el depósito de virus. La solución se mezcló cuidadosamente y se dejó incubar durante la noche a 4°C. La inactivación de la β-propiolactona se logró por incubación a 37°C durante 4 horas.

50 **[0228]** Para evaluar la eficacia de la inactivación, alícuotas del virus inactivado se diluyeron en serie en células LLC-MK2 y se incubaron durante 7 días. No se observó detección de virus en la muestra inactivada según lo determinado por el efecto citopático (CPE). La concentración total de proteína devirus inactivado por β-propiolactona se estimó en 0,5 mg/ml por BCA (Pierce Chemical). La inmunogenicidad del virus inactivado se confirmó tanto en ratones como hámsters utilizando inmunizaciones intramusculares e intranasales. Una sola dosis para una inmunización intranasal compuesta de 5 µg de virus inactivado por β-propiolactona y 10 µg de adyuvante LTK63 en un volumen total de 0,03 ml para los ratones y 0,1 ml para los hámsters. Una dosis para la inmunización intramuscular comprendió 5 µg de virus inactivado por β-propiolactona diluido en 0,05 ml de tampón de lactosa después de mezclarlo suavemente por inversión con un volumen igual de adyuvante MF59 justo antes de la inmunización. El volumen total de inmunizaciones intramusculares para tanto ratones como hámsters fue 0,1 ml.

65 Ejemplo 4:

Estimulación de una respuesta inmune específica del virus de la gripe utilizando una vacuna de partícula de replicón de alfavirus

- 5 [0229] Para demostrar la estimulación de una respuesta inmune específica de antígeno FLU, se utilizaron partículas de replicón SIN que expresan el antígeno HA para inmunizar ratones BALB/c en paralelo con la subunidad comercial de antígeno de vacuna FLU. Las partículas de replicón y las proteínas se administraron por vía intramuscular dos veces y las respuestas de anticuerpos en suero específicos de HA se determinaron por ensayo ELISA estándar después de cada inmunización.
- 10 [0230] Placas de fondo plano Nunc Maxisorp® se recubrieron durante la noche a 4°C con una solución de PBS que contenía 2,5 µg/ml de preparación de vacuna de influenza de subunidad monovalente (Chiron S.r.l., Italia). Después de lavar las placas se lavaron tres veces con PBS (pH 7,2) suplementado con 0,05% de Tween-20 (PBS-T). Después de lavar los pocillos se bloquearon contra la unión no específica usando 5% (p/v) de leche en polvo en PBS-T durante 1 hora a 37°C. Sueros de muestra se diluyeron en serie en PBS-T por tres veces a partir de 1:50. Después de la incubación con sueros diluidos en durante 90 minutos a 37°C, las placas se lavaron tres veces con PBS-T.
- 15 [0231] Las placas se incubaron adicionalmente con Ig, IgG1, IgG2a anti-ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Southern Biotechnology Associates Inc., AL) diluido en PBS-T durante 1 hora a 37°C. Después de un lavado extensivo con PBS-T, 100 µl de una solución de sustrato de cromógeno, paranitrofenilfosfato 1 mg/ml en dietanolamina, se añadieron a cada pocillo. A continuación, la placa se leyó después de 20 min a 405 nm utilizando SpectraMax® (Molecular Devices, CA). Para el cálculo de los títulos, un valor de corte se definió como el valor de la densidad óptica (DO) de la media de controles de PBS más 3 x su desviación estándar. Los títulos de anticuerpos se calcularon entonces como diluciones de los cuales las muestras generan DO del valor de corte. Como se muestra en la Figura 6, las partículas de replicón SIN eran altamente potentes en dosis ensayadas y mayor inmunogenicidad de la vacuna a base de proteína comercial.
- 20 [0232] Se observaron resultados similares en otro experimento realizado en tres diferentes cepas de ratón. Más importante aún, además de mayores títulos de anticuerpos de ELISA (unión), las partículas de replicón SIN produjeron niveles mejorados de anticuerpos neutralizantes como se determina por el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (Figura 7). Los sueros de ratones inmunizados fueron tratados con neuraminidasa mediante la adición de 4 volúmenes de prueba neuraminidasa (Dade Behring, Liederbach, Alemania) diluidos 1:50 o 1:100 en PBS (pH 7,0) y se incubaron a 37°C durante la noche. Para inactivar la neuraminidasa, se añaden 3 volúmenes de suero de solución de citrato de sodio al 2,5% y se incubaron a 56°C durante 30 minutos en un baño de agua. Se añadieron además dos volúmenes de suero de PBS para ajustar la dilución a 1:10 antes del ensayo. Veinticinco µl de sueros en serie de dos veces diluidos se dispensaron en una placa de 96 pocillos de fondo en v. Se añadió el mismo volumen de solución de virus (Resvir-17) que contiene 4 unidades de hemaglutinación a sueros diluidos.
- 25 [0233] Despues de 60 minutos de incubación a temperatura ambiente, 50 µl de suspensión de eritrocitos de pollo (0,5%) se añadieron y se incubaron adicionalmente durante 60 min a temperatura ambiente. La dilución más alta de suero que inhibe hemaglutinación se determinó visualmente. El ensayo se realizó por duplicado y la dilución promedia se tomó como el título de HI.
- 30 [0234] Las partículas de replicón derivadas de SIN que expresan HA se compararon con partículas de quimera de replicón VEE/SIN que expresan HA para determinar la inmunogenicidad relativa (Figura 8). Los ratones se inmunizaron dos veces con dosis de 10⁶, 10⁵ o 10⁴ partículas de replicón. Las muestras de suero obtenidas tras primera y segunda inmunización se analizaron por ELISA como se describió anteriormente. Mientras que las partículas de replicón SIN eran más inmunogénicas que el antígeno de vacuna de subunidad comercial, las partículas de replicón VEE/SIN proporcionan un nivel aún mayor de inmunogenicidad. Las partículas de VEE/SIN que expresan de gripe HA también se evaluaron para determinar la inmunogenicidad en macacos rhesus y se mostraron para inducir niveles significativos de anticuerpo neutralizante de gripe en base a título de HI (Figura 10).
- 35 Ejemplo 5:
- 55 [0235] Los ratones hembra Balb/c a la edad de 6 semanas fueron adquiridos de Charles River Laboratories. El virus de influenza WS/33 usado para el desafío se tituló in vivo para determinar las dosis letales para los ratones ingenuos. Para la inmunización, cada grupo de ratones (10 ratones/grupo) recibieron una dosis de 10⁶ de cualquiera de partículas de replicón que expresan de gripe HA o NA o una preparación de vacuna contra de subunidad de gripe (monovalente, reordenado de A/New Caledonia/20/99 (H1N1)) que contiene 3 µg de hemaglutinina, en un volumen de 50 µl de PBS, administrado en el músculo tibial anterior. Los ratones se inmunizaron dos veces con un intervalo de 3 semanas. Dos semanas después de la segunda inmunización, los ratones fueron desafiados con el virus de influenza WS/33 in vivo. Veinte µl (10 µl para cada orificio nasal) del fluido alantoideo descrito anteriormente diluido por 1000 veces en PBS (aproximadamente 100 LD₅₀) se administraron por vía intranasal sin anestesia para infectar el virus en el tracto respiratorio superior.

[0236] Se controlaron los animales para la mortalidad durante 2 semanas desde el día de la exposición. Como se muestra en la Figura 9, ya sea de las vacunas basadas en partículas de replicón de alfavírus que expresan de gripe NA o HA proporcionaron protección completa contra la exposición al virus de gripe intranasal. También, composiciones que expresan HA o NA mostraron un alto grado de protección contra desafío intranasal FLU, incluso a dosis de inmunización muy bajas, tales como por ejemplo 10^4 partículas de replicón o menos (Figura 21).

[0237] Además de las vacunas de gripe basadas en partícula de replicón que expresan un solo antígeno FLU, preparaciones de partículas de replicón que expresan más de un antígeno de gripe (HA + NA, véase más arriba) también mostraron un alto grado de protección en el modelo de desafío intranasal (Figura 22).

[0238] Hay que señalar que la presente invención contempla que las respuestas inmunogénicas a cualquiera de las vacunas de gripe basadas en partículas de replicón de alfavírus anteriores se pueden mejorar aún más por "impulso" de mamíferos de sangre caliente inmunizados con replicón del alfavírus con una formulación de vacuna a base de proteínas (por ejemplo, subunidad comercial o vacuna fraccionada). Esto puede ser un enfoque particularmente atractivo para pandemias de gripe que surgen de la infección humana con virus de la gripe aviar (por ejemplo, que contiene H5, H7, H9), donde las exposiciones anteriores a la infección de gripe interpandémica típica o vacunación (por ejemplo, que contiene H3, H1) y los niveles de anticuerpos existentes derivados de éstos pueden ser poco útiles.

Ejemplo de Referencia 7:

La estimulación de una respuesta inmune específica de virus de parainfluenza utilizando una vacuna de partículas de replicón de alfavírus que expresa el antígeno HN

[0239] Como se ha descrito anteriormente en este documento, las partículas de replicones de alfavírus se pueden utilizar para estimular una respuesta inmune a una variedad de patógenos respiratorios (por ejemplo, virus, bacterias, hongos) después de la administración a un mamífero de sangre caliente.

[0240] Partículas de quimera de replicón SIN o del VEE/SIN que expresan el antígeno PIV HN, como se describe en el Ejemplo de Referencia 1, se evaluaron en ratones BALB/c. Los ratones fueron inmunizados dos veces por vía IM, vía IN o IN seguido por vía IM, y anticuerpos en el suero se midieron mediante el ensayo ELISA después de la segunda inmunización (Figura 12). Grupos adicionales en este estudio de inmunogenicidad también se inmunizaron con la vacuna de PIV inactivada por diversas rutas. Para ELISA, el virus de parainfluenza de tipo tres, antígeno de grado 2 (American Research Product, Inc. nº de catálogo 123065) se recubrió en placas de ELISA de Immulon Ib durante la noche (4°C) a una concentración de 25 ng/pocillo. La unión no específica fue eliminada por el bloqueo con 0,5% de caseína, 5% de suero de cabra en PBS durante 1 hora a 37°C .

[0241] Los sueros de ensayo se diluyeron en serie en 0,5% de caseína y se incubaron durante 1 hora a 37°C después de lo cual las placas se lavaron con PBS y luego se incubaron con IgG1 anti-ratón de cabra conjugado con HRP o IgG2a (CalTag) durante 1 hora a 37°C . Los inmunocomplejos se detectaron por TMB y se leyeron de 450 nm.

[0242] Los resultados demuestran la inmunogenicidad de la partícula de replicón por la ruta o una combinación de rutas (IN (intranasal) seguido de IM (intramuscular)), y también la inmunogenicidad de la vacuna de PIV inactivado después de IM o administración IN/IM. Las dosis de partículas de replicón VEE/SIN que expresan PIV HN se ensayaron posteriormente en toda la gama de partículas 10^7 , 10^6 y 10^5 (Figura 13). Cada dosis demostró ser altamente inmunogénica.

[0243] La vacuna de PIV inactivada se caracterizó adicionalmente en presencia o ausencia de adyuvante (como se describe en el Ejemplo de Referencia 6), por una variedad de rutas. Como se muestra en la Figura 14, la adición de inmunogenicidad mejorada por adyuvante (MF59) de la vacuna inactivada por PIV administró IM. PIV inactivada administrada con adyuvante LTK63 seguido de IM con adyuvante MF59 también indujeron fuertes respuestas de anticuerpos.

Ejemplo de Referencia 8:

Eficacia de vacuna de PIV: Protección de los animales de la exposición intranasal

[0244] Además de los estudios de inmunogenicidad de ratón, se evaluaron las vacunas de PIV de la presente invención para la eficacia de la vacuna. La protección puede ser determinada después de la exposición al virus tal como se documenta en la literatura (véase, por ejemplo, Ottolini et al, 2002, J. Infect Dis 186: 1713-1717; Tao et al, 1999, Vaccine 17: 1100 a 1108; Brideau et al, 1993, J. Gen. Virol 74: 471-477; Durbin et al, 2000, Vaccine 18: 2462-2469; Pennathur et al, 2003, J. Gen. Virol. 84: 3253-3261). Para el modelo de exposición de hámster, el virus PIV3 humano sufre una infección productiva tras la exposición intranasal y se replica en los pulmones y cornetes nasales de los hámsters. Una vacuna eficaz que proporcione una protección de exposición intranasal como se evidencia por una reducción significativa en la capacidad del virus de exposición PIV para replicar en estos tejidos en los animales

vacunados.

[0245] Los grupos de 8 hámsteres se inmunizaron dos veces IM con PIV inactivado con BPL en una dosis de 5 ug en MF59, o con 10^7 partículas de replicón VEE/SIN que expresan PIV HN dos veces de MI o una vez IN seguido por una vez IM. El grupo de control recibió sólo el diluyente, sin antígeno de la vacuna. Las vacunaciones se realizaron con tres semanas de diferencia y el suero se ensayó para determinar la inducción de anticuerpos de PIV específicos dos semanas después de cada inmunización. Como se muestra en las Figuras 15 y 16 tanto la partícula de replicón como vacunas de PIV inactivadas por adyuvante indujeron altos niveles de anticuerpos PIV. Tres semanas después de la segunda inmunización, todos los animales se expusieron por vía intranasal con virus PIV. Los animales se sacrificaron cuatro días después de la exposición y títulos de virus de exposición de PIV se determinaron en los pulmones y cornetes nasales.

[0246] Como se muestra en la Figura 17, la partícula de replicón y las vacunas de PIV inactivadas proporcionaron protección completa tanto del tracto respiratorio superior como inferior de la exposición al virus. La protección tanto de los tejidos respiratorios superior como inferior de la infección por PIV3 (no simplemente de un tejido, tal como sólo pulmones) es un determinante importante y el indicador de la eficacia en estos modelos.

[0247] Para extender estos estudios de eficacia de hámster, las vacunas de PIV a base de partículas de replicón de alfavirus, rutas parenterales IM y rutas IN mucosas se compararon. Grupos de 6 hámsters fueron inmunizados dos veces en un intervalo de 3 semanas con partículas de replicón de VEE/SIN-HN (10^7 IU), por inyección IM o por administración IN gota a gota. Como se muestra en la FIG. 23, rutas tanto IN como IM generaron respuestas de anticuerpos específicas de PIV3 dos semanas posteriores a la inmunización. La exposición subsiguiente de los grupos inmunizados con IM o IN demostraron una protección completa de la replicación del virus, en los tejidos tanto de la parte superior (nasal) como inferior (pulmón) del tracto respiratorio después de la exposición PIV3 intranasal, como se observó previamente para la inmunización IM con partículas de replicón (Figura 23).

[0248] Por lo tanto, la partícula de replicón de alfavirus se puede utilizar para generar respuestas inmunitarias contra patógenos respiratorios (por ejemplo, virus), ya sea por la administración parenteral o mucosal.

30 Ejemplo de Referencia 9:

Estimulación de una respuesta inmune contra múltiples patógenos por virus respiratorios utilizando una vacuna de partícula de replicón de alfavirus que co-expresa dos antígenos

[0249] Los constructos derivados de alfavirus y enseñanzas anteriores, múltiples constructos bicistrónicos adicionales son construidos (Fig. 5). Estas construcciones pueden incluir genes que codifican proteínas a partir de más de un patógeno respiratorio, tales como los patógenos virales, bacterianos y/o fúngicos descritos anteriormente. Tales constructos preferiblemente se basan en el uso de promotores subgenómicos duplicados o elementos IRES (descritos anteriormente) como un medio para lograr la co-expresión de secuencias heterólogas (secuencias que codifican antígenos).

[0250] Se puede contemplar el uso de tales construcciones que codifican antígenos de diferentes patógenos como inmunógenos de combinación y las vacunas. Los ejemplos no limitantes de tales construcciones incluyen, por ejemplo, los constructos de replicón del alfavirus que expresan: un gen codificador de proteína RSV + un gen codificador de proteína de PIV (por ejemplo, PIV HN + RSV F), un gen codificador en proteínas RSV + un metapneumovirus humano que codifica la proteína del gen (por ejemplo, RSV G + HMPV G), un gen codificador de proteína de gripe + un gen que codifica la proteína de virus SARS (por ejemplo, gripe HA + SARS de Spike), un gen que codifica la proteína de virus SARS + un gen hMPV que codifica la proteína (por ejemplo, SARS de Spike + HMPV F), y similares. La construcción, producción y ensayo de tales materiales se realiza fácilmente por un experto en la técnica basándose en la descripción proporcionada anteriormente.

[0251] Se generó una vacuna de combinación PIV/RSV, en donde un vector de replicón de alfavirus está construido para expresar tanto un antígeno de PIV (por ejemplo, glicoproteína HN) como un antígeno del RSV (por ejemplo, glicoproteína F). Más específicamente, el constructo de vector de replicón VCR-Chim2.1-HN_{PIV3} que fue descrito previamente fue modificado adicionalmente para co-expresar la glicoproteína F_{RSV}. La glicoproteína F, junto con un promotor subgenómico del alfavirus, se amplificó por PCR en condiciones convencionales usando la plantilla VCR-Chim2.1-F_{RSV} (también descrito anteriormente) y los siguientes cebadores de oligonucleótidos:

SGP-delantero: 5'-ATATATATATGCGGCCGCTGGAGGGTTATTTGTGTGAC (SEQ ID NO: 33)

RSV F-inverso: 5'-ATATATATATCCCGCGCCGCTTAGTTACTAAATGCAATTATTATAC (SEQ ID NO: 34)

[0252] El fragmento de PCR que contiene el promotor de la región de unión subgenómica de alfavirus unido operativamente al gen F_{RSV} fue digerido con NotI y se ligó en VCR-Chim2.1-HN_{PIV3} que también fue digerido con NotI y tratado con fosfatasa alcalina, para crear el constructo bicistrónico VCR-Chim2.1-HN_{PIV3}-sgp-F_{RSV}.

[0253] El vector de replicón de alfavirus bicistrónico se utilizó para producir una preparación de vacuna de

combinación PIV/RSV a base de partículas de replicón (designada VEE/SIN-HN_{PIV3}-sgp-F_{RSV}) y la expresión de tanto de antígenos de RSV F como de PIV HN fue confirmada por inmunotinción usando anticuerpos específicos de antígeno apropiados.

5 [0254] Con referencia ahora a la Figura 24, se muestran los resultados de estudios de clasificación de células activadas fluorescentes que demuestran la expresión de los dos antígenos heterólogos en las células por el vector de replicón. Se recogieron las células, se fijaron y se permeabilizaron con Cytofix/Cytoperm (Pharmigen # 554722) y muestras duplicadas se incubaron con un anticuerpo específico RSV (anti-RSV-FITC de cabra conjugado, de Chemicon Int.) o anticuerpo específico a PIV (anticuerpo primario anti-PIV3 de hámster, seguido de Alexa 488 de hámster anti-cabra conjugado, de Molecular Probes, Inc). La Figura 24 demuestra la expresión tanto de PIV3 HN como F_{RSV} a partir del vector de replicón de alfavirus bicistrónico.

10 [0255] Estas preparaciones de vacuna de partículas de replicones pueden evaluarse en modelos animales apropiados para la inmunogenicidad y eficacia como se detalló anteriormente.

15 [0256] Otras combinaciones de antígenos de patógenos de las vías respiratorias se pueden expresar de manera similar en una configuración bicistrónica para su uso como una composición inmunogénica o vacuna, basada en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento.

20 Ejemplo de referencia 10:

La estimulación de una respuesta inmune frente a múltiples patógenos respiratorios utilizando una vacuna que comprende al menos dos poblaciones de partículas de replicones de alfavirus que expresan diferentes antígenos

25 [0257] Partículas de replicón del vector que codifican uno o más antígenos de polipéptidos de un primer patógeno respiratorio como se describe anteriormente, se puede combinar con partículas de replicón que codifican uno o más antígenos de polipéptidos a partir de un segundo patógeno respiratorio como se describe anteriormente, como una composición inmunogénica útil en la profilaxis de más de una enfermedad. Tales vacunas de combinación pueden incluir una amplia variedad de diferentes combinaciones, incluyendo al menos dos de tales poblaciones de partículas de replicón, tres o más de tales poblaciones de partículas de replicón y cuatro o más de tales combinaciones de partículas de replicón.

30 [0258] Además, se contempla que las composiciones inmunogénicas pueden comprender al menos dos partículas de replicón que codifican antígeno a partir de patógenos virales respiratorios separados, pueden incluir partículas de replicón que expresan antígenos individuales o múltiples antígenos (por ejemplo, bicistrónicos, consulte las Figuras 2-5). Los ejemplos no limitantes incluyen, por ejemplo, un RSV que codifica la proteína del gen + un gen que codifica la proteína de PIV (por ejemplo, PIV HN + RSV F), un gen que codifica la proteína RSV + un gen que codifica la proteína metapneumovirus humano (por ejemplo, RSV G + HMPV G), un gen codificante de proteína de gripe + un gen que codifica la proteína virus SARS (por ejemplo, gripe HA + SARS de Spike), un gen que codifica proteína de virus SARS + un gen que codifica la proteína HMPV (por ejemplo, SARS Spike + hMPV F), y similares.

35 [0259] Otros ejemplos, y no a modo de limitación, incluyen una composición inmunogénica que comprende partículas de replicón de alfavirus que expresan partículas de replicón PIV HN + que expresan RSV G, partículas de replicón que expresan partículas de replicón PIV HN + que expresan HMPV G, partículas de replicón que expresan de FLU HA + partículas de replicón que expresan SARS S, partículas de replicón que expresan FLU HA + partículas de replicón que expresan HMPV G, partículas de replicón que expresan partículas de replicón SARS S + que expresan HMPV G, partículas de replicón que co-expresan PIV HN y F + partículas de replicón que co-expresan RSV G y F, y similares. Tales composiciones inmunogénicas se pueden evaluar en modelos animales apropiados para la inmunogenicidad y la eficacia como se detalla anteriormente.

40 [0260] Específicamente, para demostrar que las composiciones inmunogénicas que comprenden una mezcla de al menos dos poblaciones de partículas de replicón que expresan antígenos de diferentes patógenos respiratorios inducen respuestas inmunes potentes contra cada uno de los múltiples antígenos codificados sin interferencia, evaluamos proteínas a partir de dos de los agentes patógenos anteriores. Partículas de replicón VEE/SIN que expresan de FLU HA se combinaron con partículas de replicón VEE/SIN que expresan PIV HN, con el fin de producir una preparación de vacuna de combinación PIV/FLU (Figuras 18, 19 y 25).

45 [0261] La inducción de anticuerpos con esta vacuna de combinación se comparó en los experimentos con animales de cabeza a cabeza con partículas de replicón que expresan sólo FLU HA o solamente PIV-HN. Como se demuestra en las Figuras 18 y 25, la vacuna de combinación PIV/FLU a base de partícula de replicón suscitó anticuerpo específico a PIV a niveles comparables a las partículas de replicón que expresan PIV HN solo. La misma vacuna de combinación PIV/FLU también indujo anticuerpos de FLU HA a niveles comparables a las partículas de replicón que expresan FLU HA solo (Figura 19).

50 [0262] Una composición de vacuna inmunogénica que comprende una combinación de partículas de replicón de alfavirus que codifica una glicoproteína RSV F (VEE/SIN-F_{RSV}) y partículas de replicón de alfavirus que codifican una

glicoproteína PIV3 HN (VEE/SIN- HN_{PIV3}) se produjo usando el PIV individuo y componentes de la vacuna del RSV descritos anteriormente. La expresión de los antígenos tanto de RSV F como PIV HN se confirmó mediante inmunotinción usando anticuerpos específicos de antígeno apropiados.

5 [0263] La Figura 24 muestra los resultados de los estudios de clasificación de células activadas por fluorescencia y demuestra la expresión de los dos antígenos en las células por vectores de replicón combinados. Se recogieron las células, se fijaron y se permeabilizaron con Cytofix/Cytoperm (Pharmigen # 554722) y muestras duplicadas se incubaron con un anticuerpo específico de RSV (anti-RSV-FITC de cabra conjugado, de Chemicon Int.) o anticuerpo específico a PIV (anticuerpo primario anti-PIV3 de hámster, seguido de Alexa 488 anti-hámster de cabra conjugado, de Molecular Probes, Inc). Como se muestra en la Figura 24, tanto PIV3 HN como RSV F se expresaron a partir de los vectores de combinación PIV/RSV basados en replicón de alfavírus.

10 [0264] La preparación de la vacuna de partícula de replicón se evalúa en modelos animales apropiados para la inmunogenicidad y eficacia como se detalló anteriormente.

15 [0265] Estos resultados demuestran la utilidad de las partículas de replicones del alfavírus como una plataforma para vacunas de combinación contra patógenos respiratorios, tales como virus. Otros antígenos de patógenos respiratorios pueden ser expresados de manera similar en tales combinaciones de partículas de replicón para uso como una composición inmunogénica o vacuna, en base a las enseñanzas proporcionadas en el presente documento..

20 [0266] Además, como se demuestra en la Figura 20, tales vacunas de combinación no necesitan necesariamente ser co-administradas como una mezcla de partículas de replicón. Más bien partículas de replicón que expresan un primer antígeno (en este ejemplo, el SARS de Spike) pueden administrarse, y luego seguirse por la inmunización con partículas de replicón que expresan un segundo antígeno (en este ejemplo, FLU HA), sin ninguna inhibición de la respuesta a los segundos antígenos codificados en comparación con la vacunación de ratones sin tratamiento previo con las partículas de replicón de codificación de FLU HA.

25 [0267] La recitación de intervalos de valores en el presente documento están destinados simplemente a servir como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del rango, a menos que se indique lo contrario en este documento, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se citara individualmente en este documento.

30 [0268] Las realizaciones preferidas de esta invención se describen en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Por supuesto, las variaciones de estas realizaciones preferidas serán evidentes para personas de experiencia ordinaria en la técnica al leer la descripción anterior.

LISTADO DE SECUENCIAS

40 [0269]

- <110> Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.
- 45 <120> VECTORES ALFAVIRUS PARA VACUNAS DE VIRUS CONTRA LA GRIPE
- <130> P064917EP
- 50 <140> EP
- <141> 2005-05-20
- <150> US60/573433
- <151> 2005-01-12
- 55 <150> US60/643737
- <151> 2004-05-21
- <160> 34
- 60 <170> SeqWin2010, versión 1.0
- <210> 1
- <400> 1
- 65 000

5 <210> 2
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 2
 gggtcgactg cagccgccac catgaagact atcattgct 39
 <210> 3
 <211> 39
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 3
 gcatgcggcc gcatcgattc aaatgcaaat gttgcacct 39
 <210> 4
 <211> 38
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 4
 gggtcgacag atctgccgcc accatgaatc caaatcaa 38
 <210> 5
 35 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40 <400> 5
 gcatgcggcc gcatcgattt tataggcatg agattgtatg 39
 <210> 6
 45 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador
 <400> 6
 gggtcgactg cagccgccac catgaaggca aaactact 38
 55 <210> 7
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador
 <220>
 <221> R
 65 <222> 34
 <223> R = A o G

<400> 7
 gcatgcggcc gcatcgattc agatgcata tctrca 36

5 <210> 8
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador

<220>
 <221> R

15 <222> 38
 <223> R = A o G

<400> 8
 gggtcgacag atctgccgcc accatgaatc caaaccara 39

20 <210> 9
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador

<220>
 <221> S

30 <222> 32
 <223> S = C o G

<400> 9
 35 gcatgcggcc gcatcgatct acttgtcaat gstga 35

<210> 10
 <211> 42
 <212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

45 <220>
 <221> Y
 <222> 32
 <223> Y = C o T

50 <400> 10
 gggtcgactc tagagccgcc accatggcgt cycaaggcac ca 42

<210> 11
 <211> 35

55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

60 <220>
 <221> Y
 <222> 33
 <223> Y = C o T

65 <400> 11

gcatgcggcc gcatcgatta attgtcgtay tcytc 35
 <210> 12
 <211> 44
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 10 <220>
 <221> R
 <222> 30
 <223> R = A o G
 15 <220>
 <221> R
 <222> 32
 <223> R = A o G
 20 <220>
 <221> Y
 <222> 35
 <223> Y = C o T
 25 <400> 12
 gcatggcgcg ccgtcgacgc caccatggar araayagtgc ttct 44
 <210> 13
 30 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Cebador
 <220>
 35 <221> R
 <222> 27
 <223> R = A o G
 <400> 13
 40 gcatgcggcc gcatcgatta aatgaratt ctgc 34
 <210> 14
 <211> 41
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 14
 ttggcgcgc catcgatgt atctgattt ccaccatatt g 41
 <210> 15
 <211> 40
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 15
 gcatgcggcc gcgtcgactt atcatcgatgt tttcaaagg 40
 <210> 16
 65 <211> 40
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Cebador

<400> 16
atatatatat gcggccgctg gagggtttat ttgtgtgac 40

10 <210> 17
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador

<400> 17
atatatatat gtagcggcg ccgcacatcgat tc 32

20 <210> 18
<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador

<400> 18

30

ctagaagaat	caaaagaatg	gataagaagg	tcaaatcaa	aactagattc	tattggaaat	60
tggcatcaat	ctagcacta					79

35 <210> 19
<211> 88
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador

<400> 19

45

tagtacttaa	tttgtatgt	agattgatgc	caatttccaa	tagaatctag	tttttgattt	60
gaccttctta	tccattttt	tgatttctt				88

50 <210> 20
<211> 79
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Cebador

<400> 20

60

ctagaagaat	caaaagaatg	gataagaagg	tcaaatcaa	aactagattc	tattggaaat	60
tggcatcaat	ctagcacta					79

65 <210> 21
<211> 70

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador

<400> 21

10 ggccgcttat ttgtttgtta gtacatatgg cttgtcattt tgatccactc gatttctt 60
ttgaattctg 70

15 <210> 22
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 22
atataatat atacggcgcg aac ccaccatgcc 33

25 <210> 23
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 23
atataatat gcggccgctt atgttgtctt agattgtgc caatttc 47

35 <210> 24
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Cebador

<400> 24
atataatatgg cgcgccccac catgtccaaa aacaaggacc aac 43

45 <210> 25
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Cebador

<400> 25
atataatat gcggccgcct actggcgtgg tttttttttt 39

55 <210> 26
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Cebador

<400> 26
atataatatgg cgcgccccac catggagttt ctaatccca AAGC 44

5 <210> 27
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador
 15 <400> 27
 atatatatatat gcggccgctt agttactaaa tgcaatatta tttatac 47
 <210> 28
 <211> 42
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 20 <400> 28
 atatatatgg cgcgccccac catggaggtg aaagtggaga ac 42
 <210> 29
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Cebador
 <400> 29
 atatatatatat gcggccgctt aactagttg gttgtatgtt gttg 44
 35 <210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cebador
 <400> 30
 ctcataaaca aatccataag ttcg 24
 45 <210> 31
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador
 <400> 31
 55 atatatatatat cctcagccca ccatgtttat ttcttattta ttcttactc 50
 <210> 32
 <211> 41
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 65 <400> 32
 atatatatgc ggccgctt gtgtaatgtt atttgacacc c 41

<210> 33
<211> 40
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

10 <400> 33
atatatatat gcggccgctg gagggtttat ttttgtgtac 40

<210> 34
<211> 49
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador
20 <400> 34
atatatatat ccgcggccgc ttagtacta aatgcaatat tatttatac 49

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Una composición inmunogénica que comprende:

(a) un vector replicón de alfavírus que comprende

- (i) un primer ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína de virus de la gripe, y
- (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína de virus de la gripe,

en el que dicha segunda secuencia de ácido nucleico heterólogo es diferente de dicha primera secuencia de ácido nucleico heterólogo; y
 (b) un vehículo, diluyente, o excipiente farmacéuticamente.

2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que dicho antígeno de proteína primero y segundo se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en: una hemaglutinina (HA), una neuraminidasa (NA), una nucleocápsida (NP), una proteína de la matriz (M1), una proteína de canal iónico (M2), NS1, NS2, PB1, PB2, PA, un fragmento inmunogénico de la misma.

3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicho primer antígeno de proteína es una hemaglutinina de la gripe (HA) o un fragmento inmunogénico de la misma.

4. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicho primer ácido nucleico heterólogo es de un virus de la gripe que tiene un subtipo seleccionado del grupo que consiste de subtipos H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, y H15.

5. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicho segundo antígeno de proteína es una neuraminidasa de influenza (NA) o fragmento inmunogénico de la misma.

6. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que dicho segundo ácido nucleico heterólogo es de un virus de la gripe que tiene un subtipo seleccionado del grupo que consiste en subtipos N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, y N9.

7. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicho primer antígeno de proteína es una hemaglutinina de influenza o un fragmento inmunogénico de la misma, y dicho segundo antígeno de proteína es una neuraminidasa de la gripe o un fragmento inmunogénico de la misma.

8. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el primer heterólogo y/o segunda secuencia de ácido nucleico se unen operativamente a un promotor subgenómico de alfavírus.

9. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que las secuencias de ácidos nucleicos heterólogos primera, segunda, o ambas comprenden además un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES).

10. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el vector de replicón de alfavírus se deriva de un alfavírus seleccionado entre el grupo que consiste en: un virus Sindbis, un virus del bosque de Semliki, un virus de la encefalitis equina venezolana, y un virus del río Ross.

11. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en la estimulación de una respuesta inmune profiláctica en un mamífero.

12. La composición inmunogénica para el uso de la reivindicación 11, además de para su uso en combinación con una segunda composición inmunogénica que comprende:

- a. un antígeno de proteína o fragmento inmunogénico de la misma, de la misma cepa de la gripe como el primer antígeno de proteína; y
- b. un vehículo, diluyente, o excipiente aceptable farmacéuticamente.

FIG. 1 Configuración ejemplar representativa de replicón alfavírus y componentes de envasado para la producción de partículas de replicón

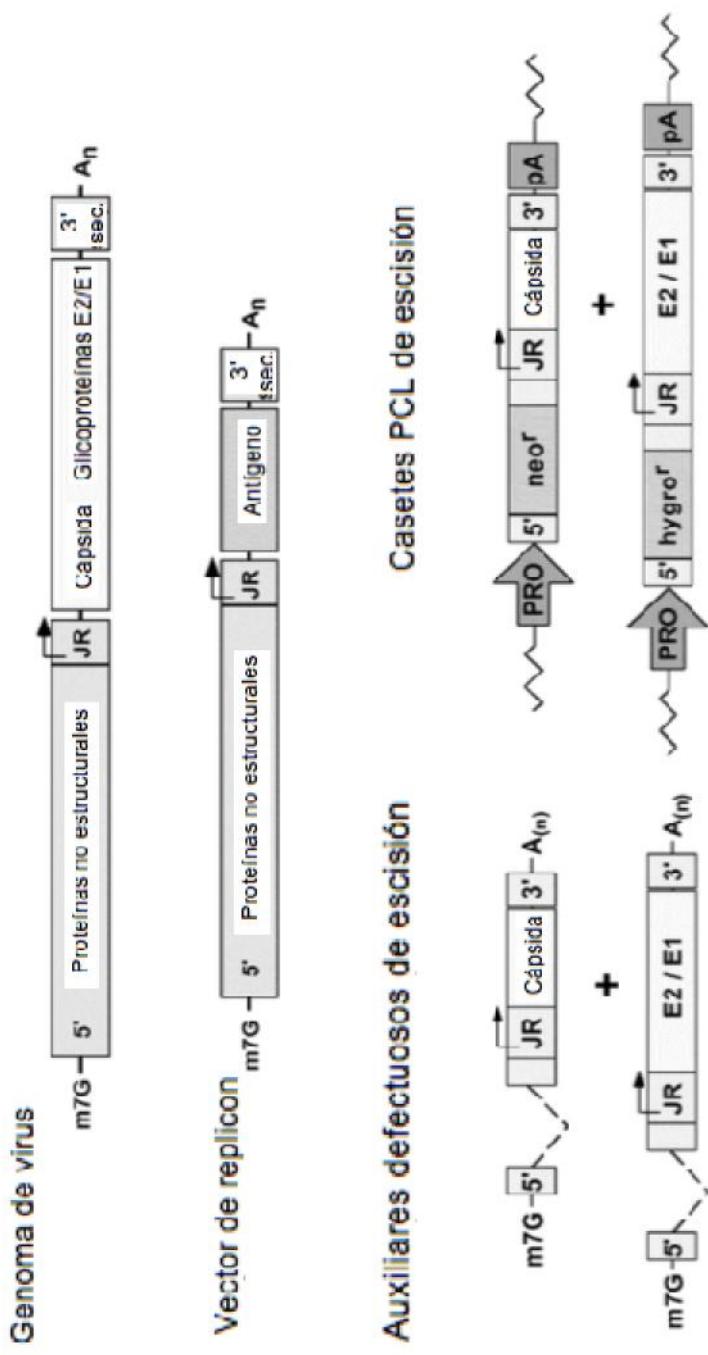


FIG. 2 Vectores de replicón de alfavírus representativos que codifican uno o más antígeno(s) de virus de influenza

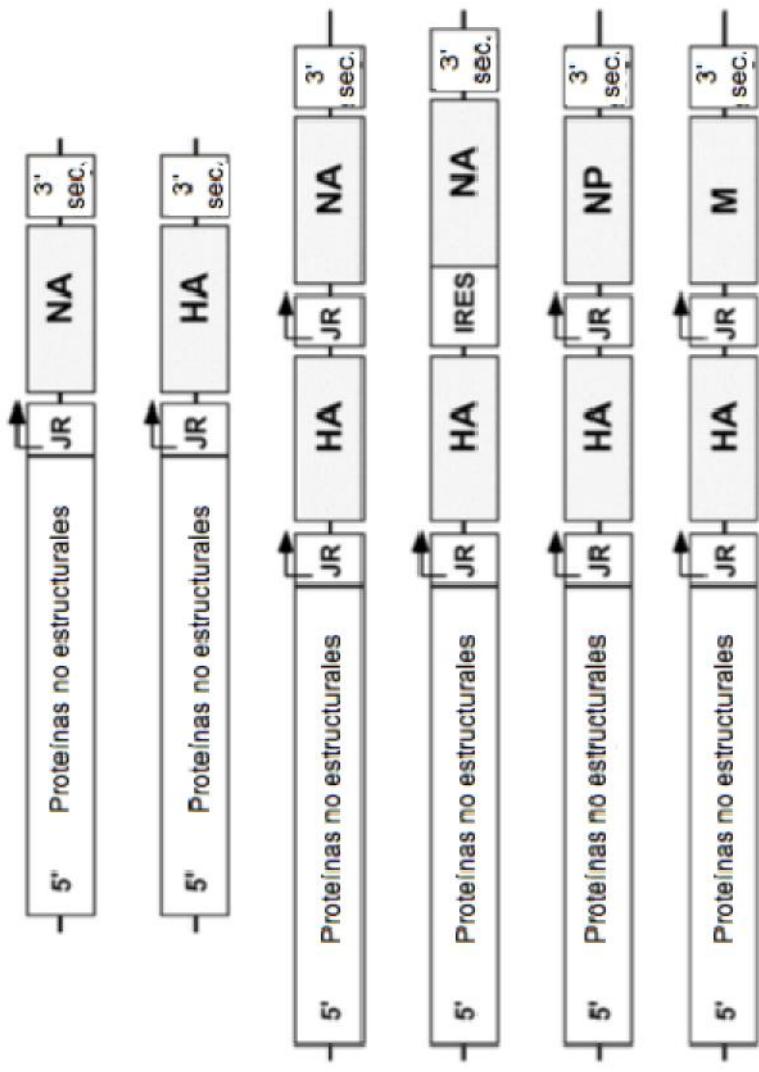


FIG. 3 Vectores de replicón de alfavirus representativos que codifican uno o más antígeno(s) de virus de parainfluenza

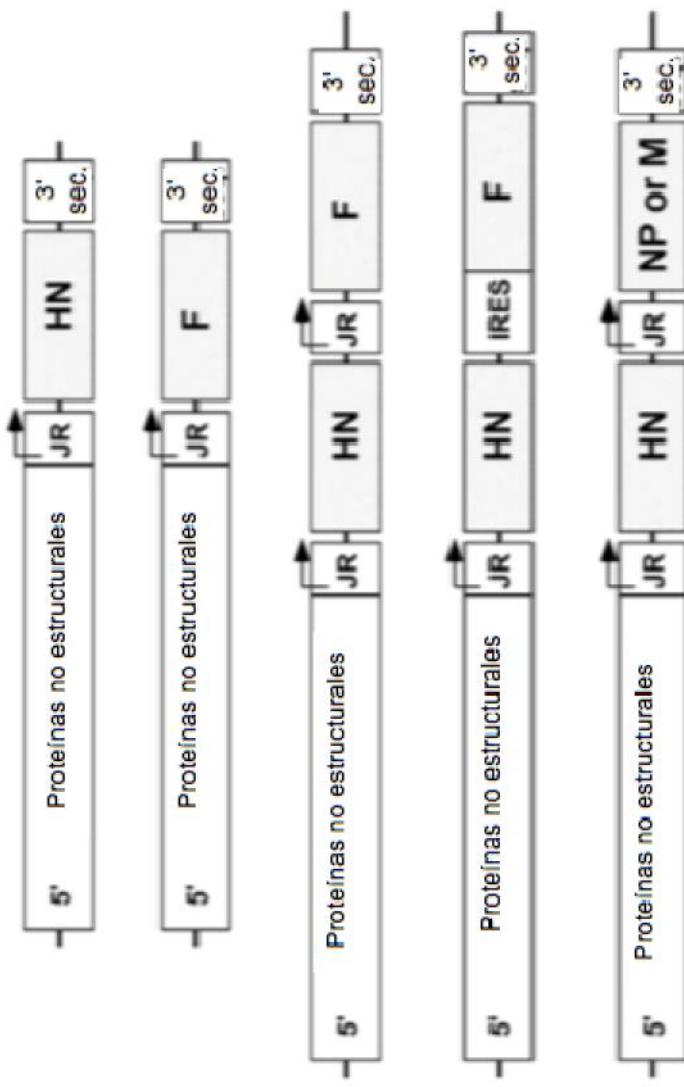


FIG. 4 Vectores de replicón de alfavírus representativos que codifican uno o más antígeno(s) de virus de sincitio respiratorio

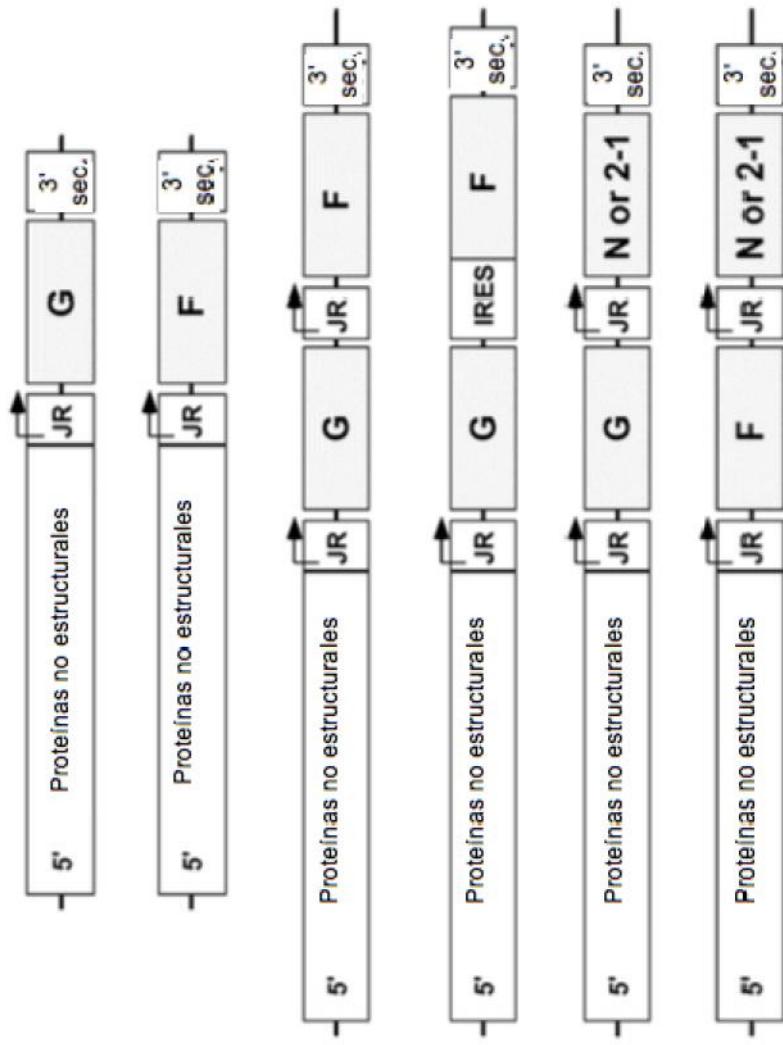


FIG. 5 Vectores de replicón de alfavirus representativos que codifican uno o más patógeno(s) de virus respiratorio

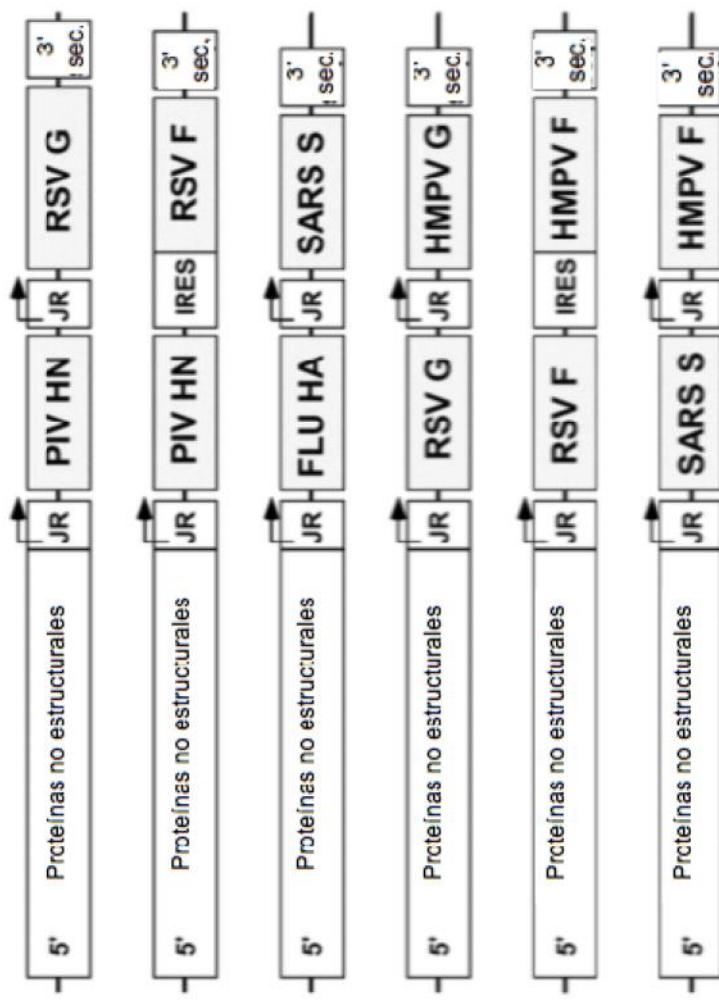


FIG. 6 Inducción de respuestas de anticuerpo FLU HA más altas immunizando con partículas de replicón SIN-HA en comparación con vacuna de subunidad HA

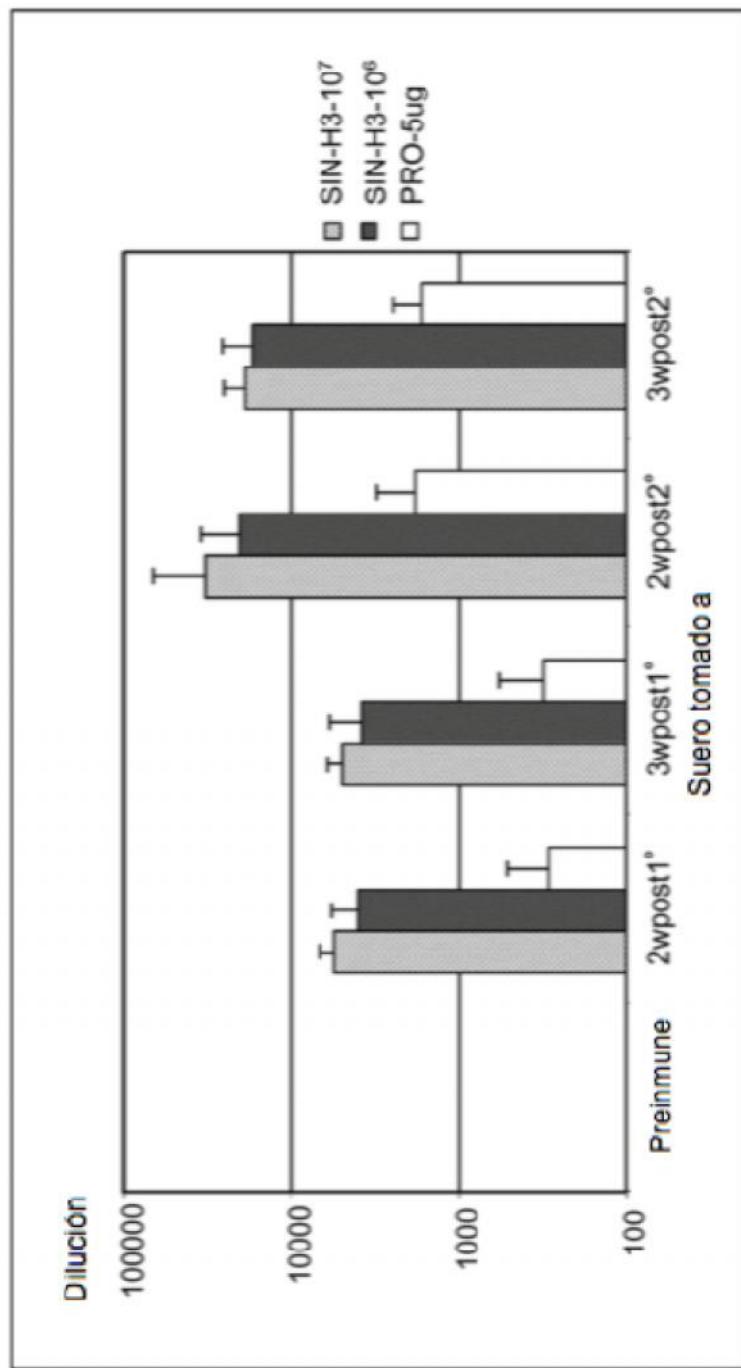


FIG. 7 Inducción de títulos HI de nivel más alto en ratones tras inmunización con partículas de replicón de SIN-HA en comparación con vacuna de subunidad de HA

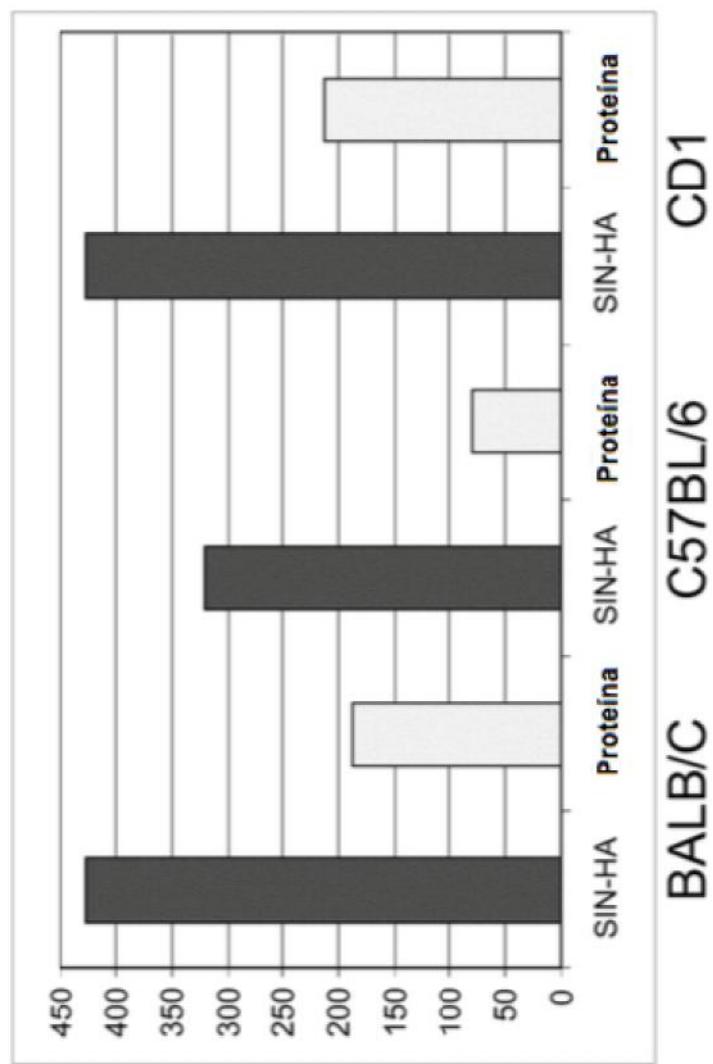


Fig. 8 Comparación de dosis en ratones BALB/c de químera VEE/SIN y partículas de replicón SIN que expresan proteína FLU HU

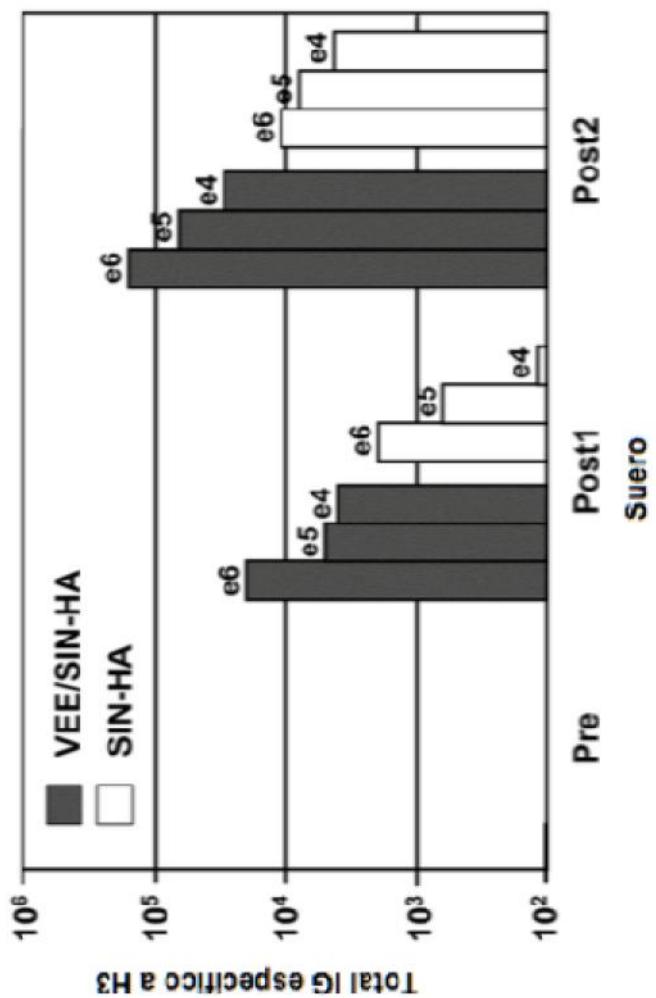


Fig. 9 Protección de ratones de exposición FLU tras inmunización con partículas de replicón de VEE/SIN que expresan FLU NA o HA

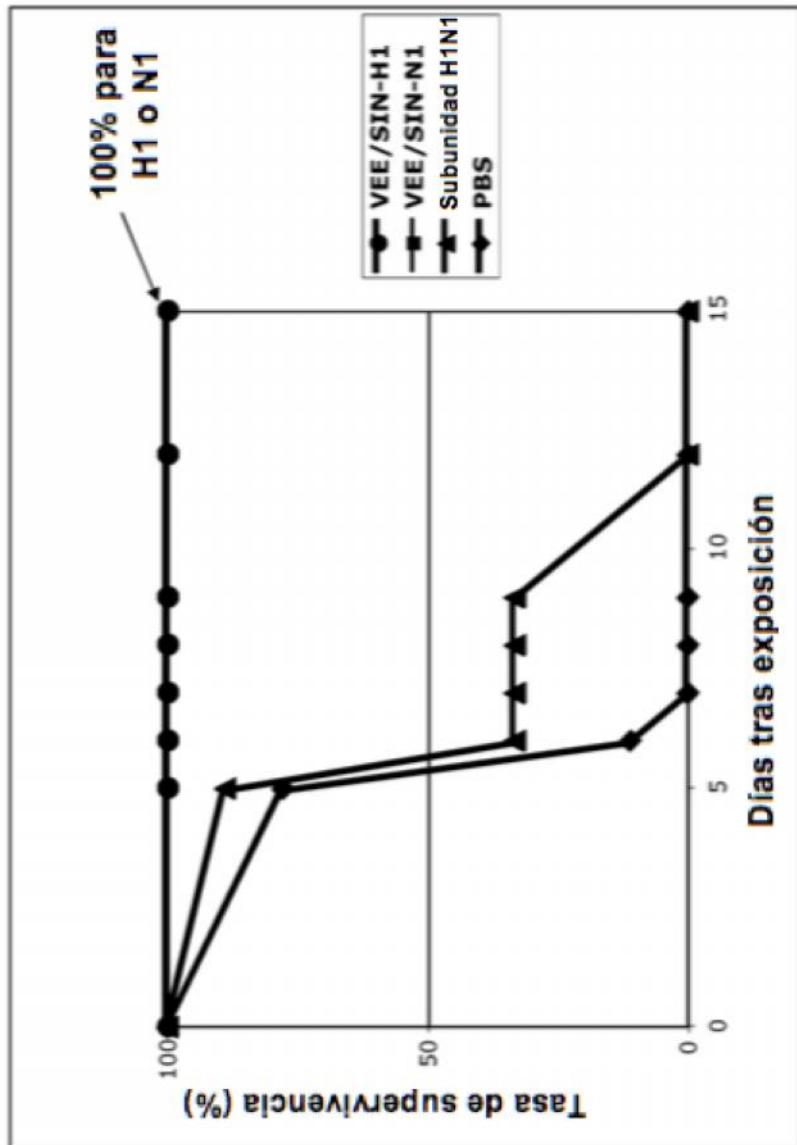


Figura 10. Inducción de anticuerpos neutralizantes específicos a FLU HA en macacos rhesus inmunizados con partículas VEE/SIN-FLU HA

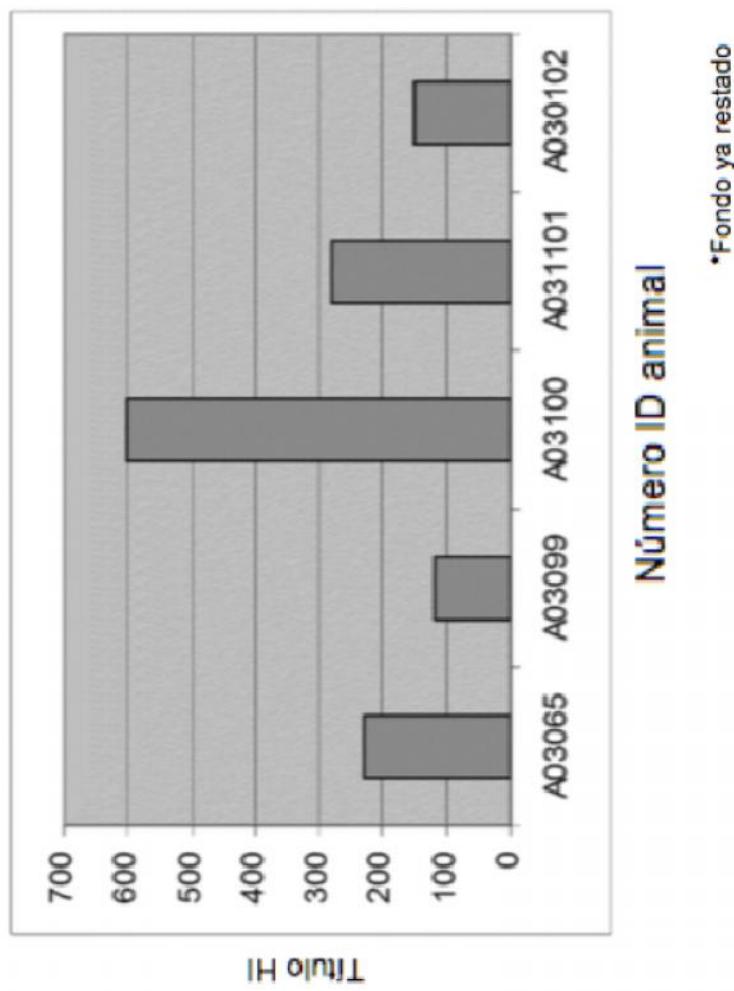


Figura 11. Expresión de FLU HA y NA de partículas de replicón de alfavírus bicistrónico, utilizando promotores subgenómicos dobles o un IRES

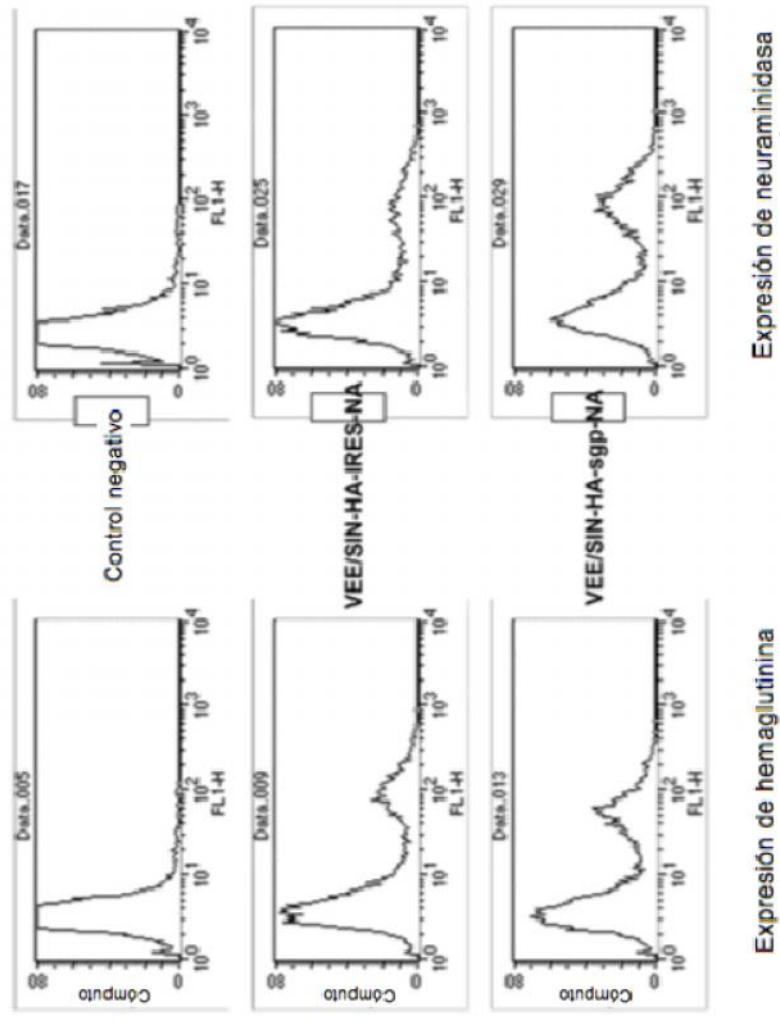
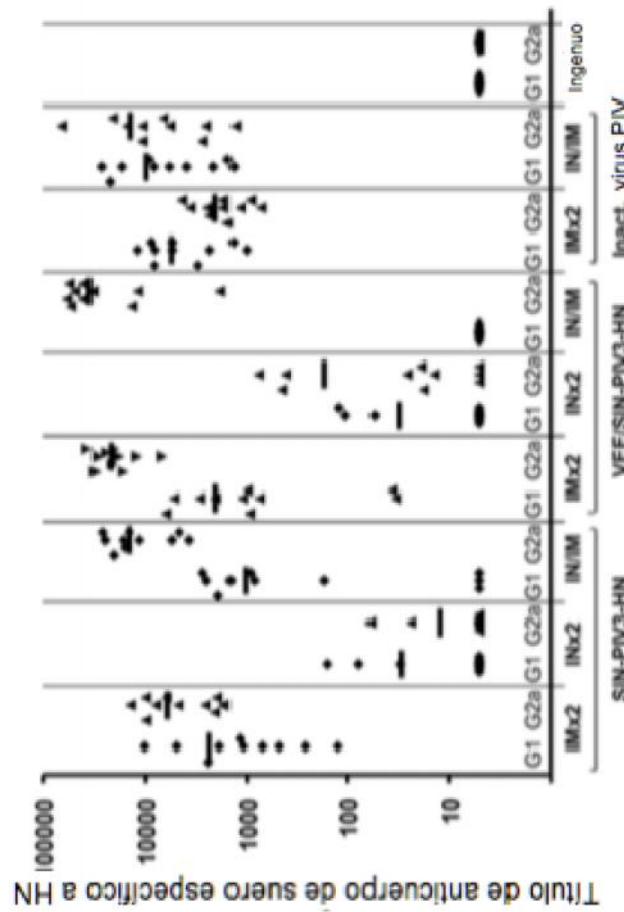
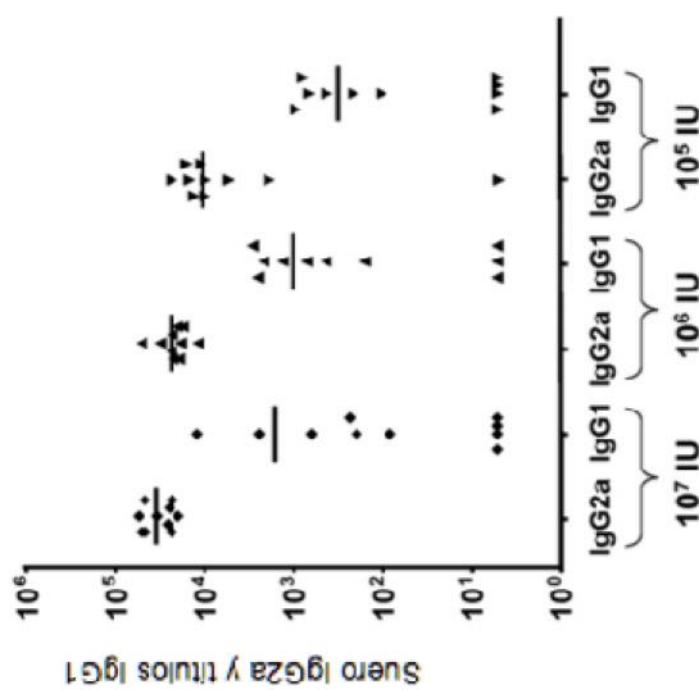


Fig. 12 Inducción de respuestas de anticuerpo específicas a PIV tras inmunización con partículas de replicón de alavirus que expresan PIV HN



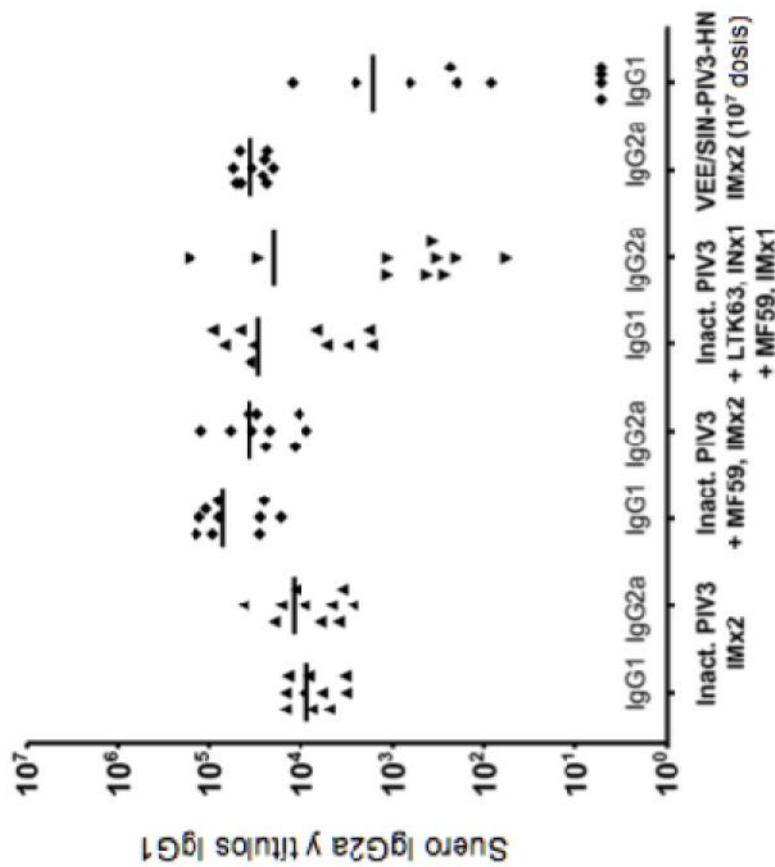
*Títulos de isótipo IgG como G1 (IgG1) o G2a (IgG2a) para cada inmunogen y rata

Figura 13. Respuestas de anticuerpo de suero específico a PIV tras inmunización con varias dosis de partículas de replicón de alfavírus que expresan PIV3 HN



*Titulo de Isotipo IgG1 y IgG2a mostrado para cada dosis de vacuna

Figura 14. Respuestas de anticuerpo de suero específico a PIV de vacunas PIV inactivadas +/- adyuvantes, administrados por rutas IM o IN



*Titulo de isotipo IgG1 e IgG2a mostrado para cada modalidad de vacuna

Figura 15. Suero IgG específico a PIV en hamsters 2 semanas tras la 1^a inmunización con partículas VEE/SIN-PIV3-HN o PIV3/MF59 inactivada

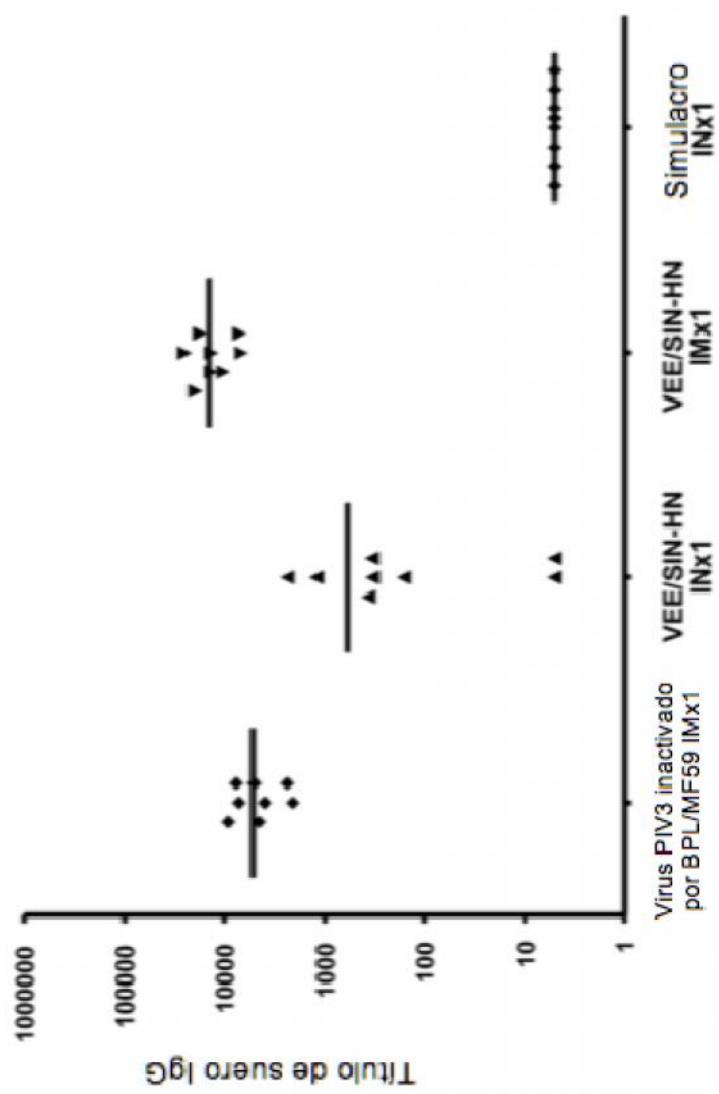


Figura 16. Suero IgG específico a PIV3 en hámsters 2 semanas tras 2^a inmunización con partículas VEE/SIN-PIV3-HN o PIV3/MF59

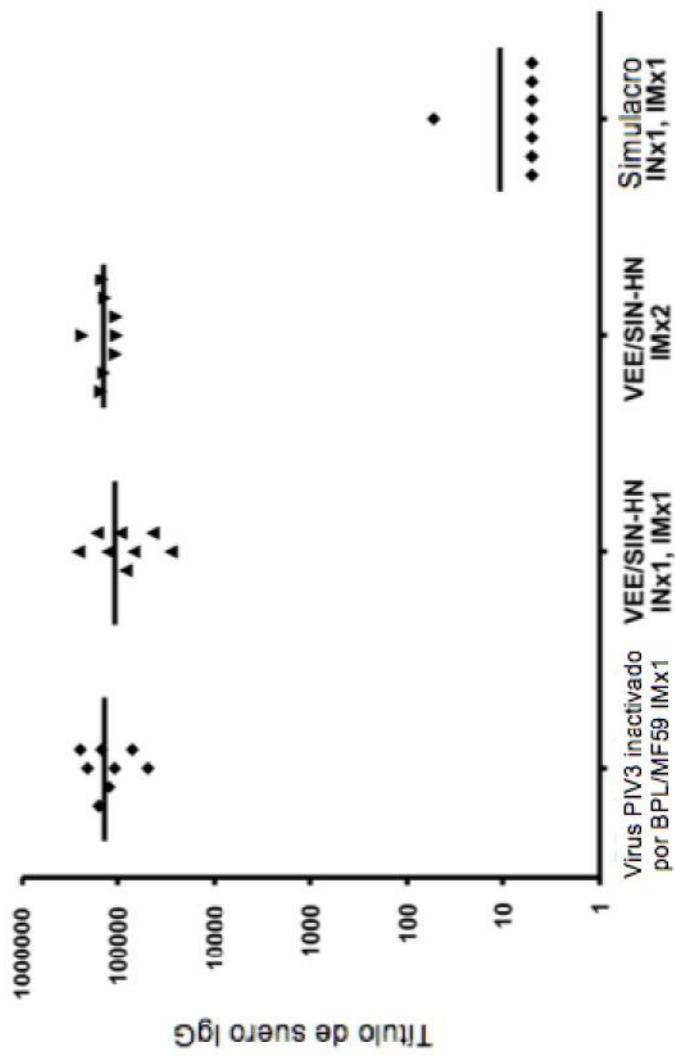
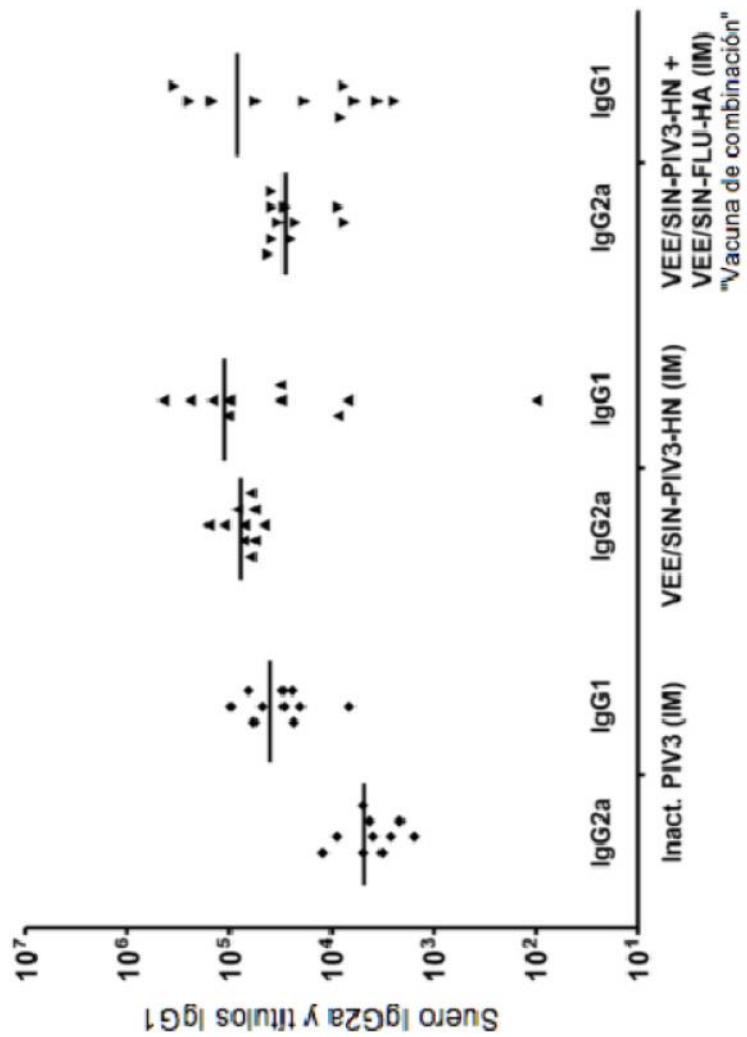


Figura 17. Partícula de replicón VEE/SIN-HN y vacunas de PIV3 inactivadas adyuvantadas por MF59 completamente protegen hámsters de exposición intranasal a PIV3

Inmunización	Ruta	Turbinatos nasales		Pulmones	
		Tituo medio + SEM (log ₁₀ TCID ₅₀ /gm)	Reducción en tituo (log ₁₀)	Tituo medio + SEM (log ₁₀ TCID ₅₀ /gm)	Reducción en tituo (log ₁₀)
Simulacrc	IN/IM	5.3 + 0.2	N/A	4.5 + 0.4	N/A
BPL-PIV3 + MF59	IM/IM	≤ 1.5 + 0.0	≥ 3.8	≤ 1.5 + 0.0	≥ 3.0
VEE/SIN-HN	IM/IM	≤ 1.5 + 0.0	≥ 3.8	≤ 1.5 + 0.0	≥ 3.0
VEE/SIN-HN	IN/IM	≤ 1.5 + 0.0	≥ 3.8	≤ 1.5 + 0.0	≥ 3.0

Figura 18. Respuestas de anticuerpo de suero específicas a PIV de PIV inactivada o partícula de replicón de alfabirus PIV y vacunas de combinación PIV/FLU



Títulos de anticuerpo de suero 2WP3 específicos a isotipos anti-PIV3

"Vacuna de combinación"
VEE/SIN-PIV3-HN +
VEE/SIN-FLU-HA (IM)

Figura 19. Respuestas de anticuerpo de suero específicas a FLU de partícula de replicón de alfavírus FLU y vacunas de combinación PIV/FLU

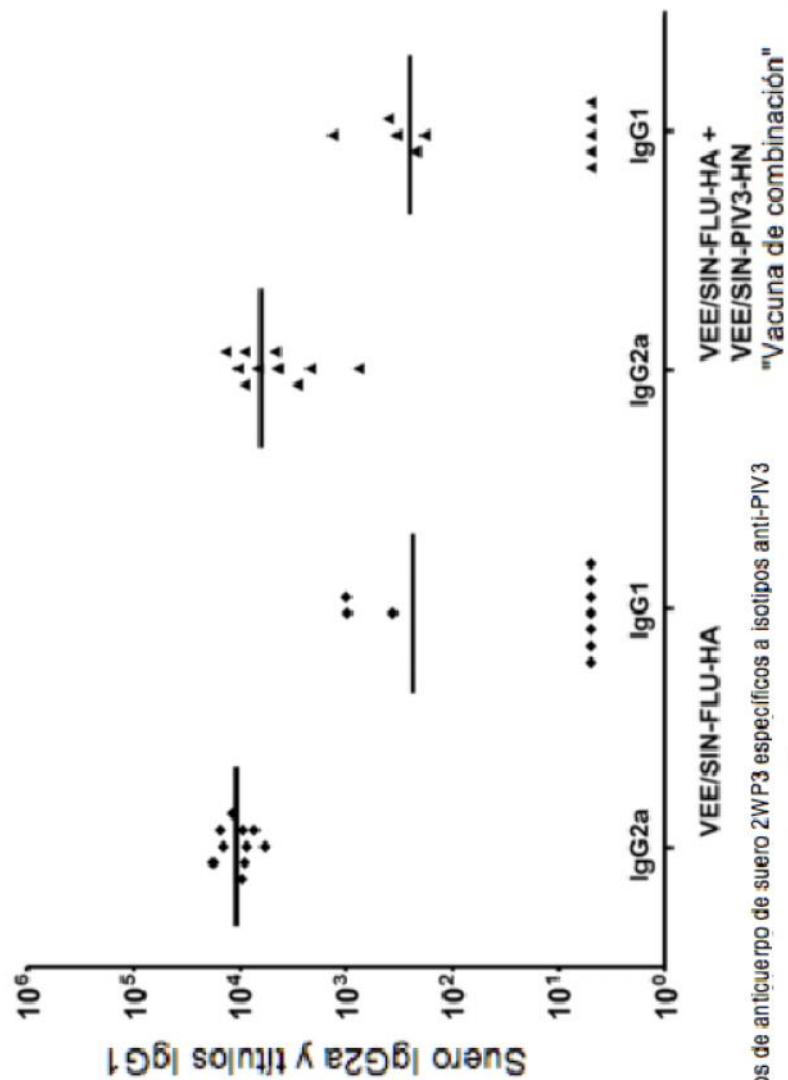


Figura 20. Inmunización contra SARS y FLU por administración secuencial de partículas de replicón VEE/SIN-SARS-Pico y VEE/SIN-FLU-HA

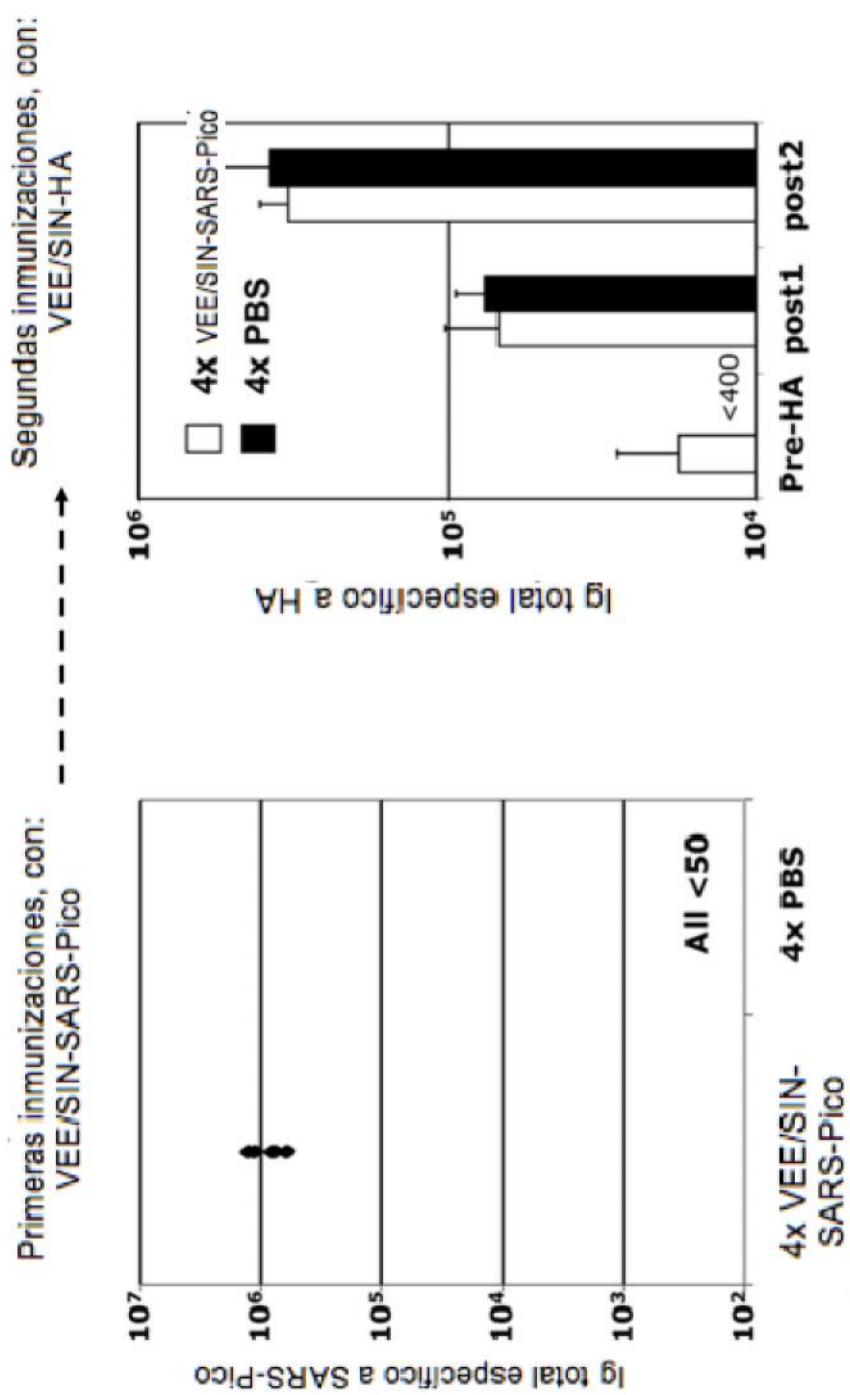


Figura 21. Vacunas de partículas de replicón de alfavírus de dosis baja que expresan HA o NA protegen a los ratones de exposición intranasal a FLU

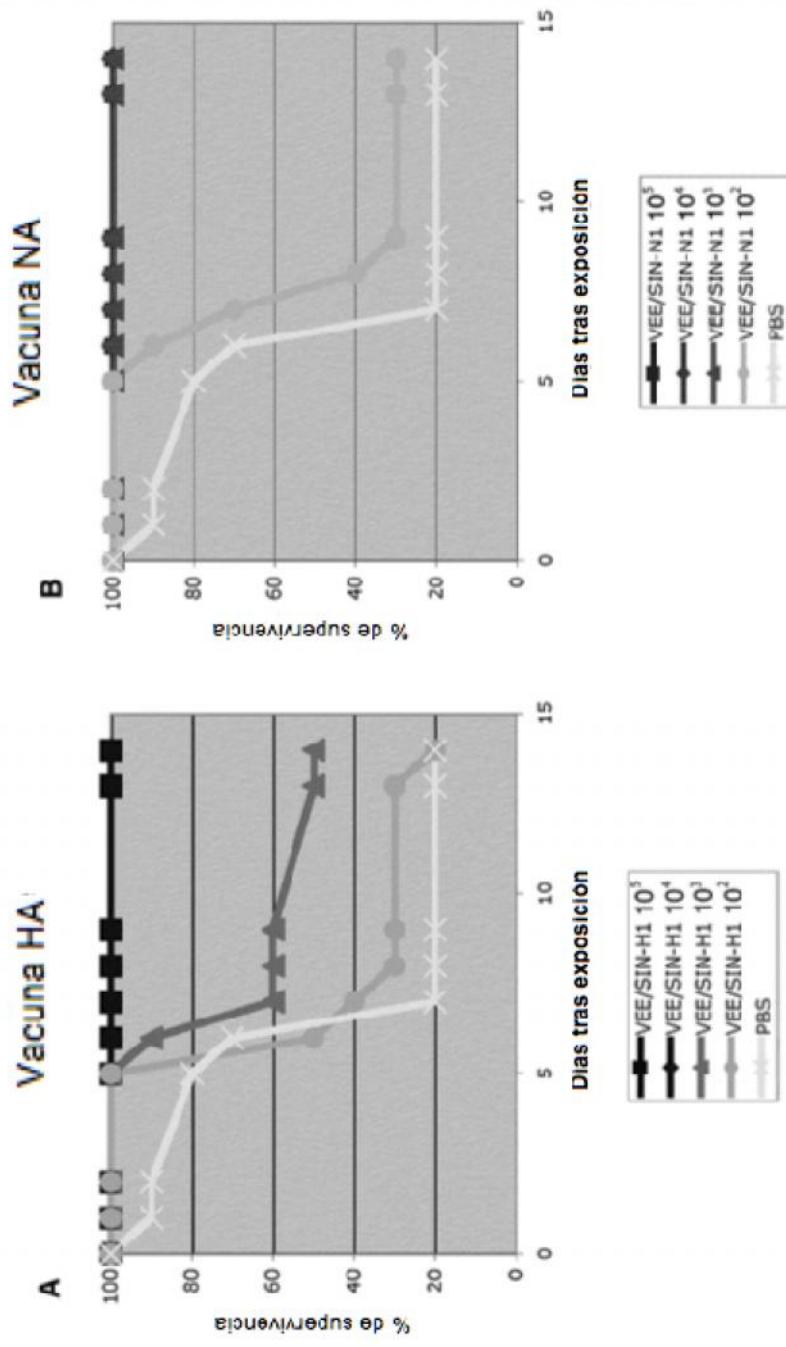
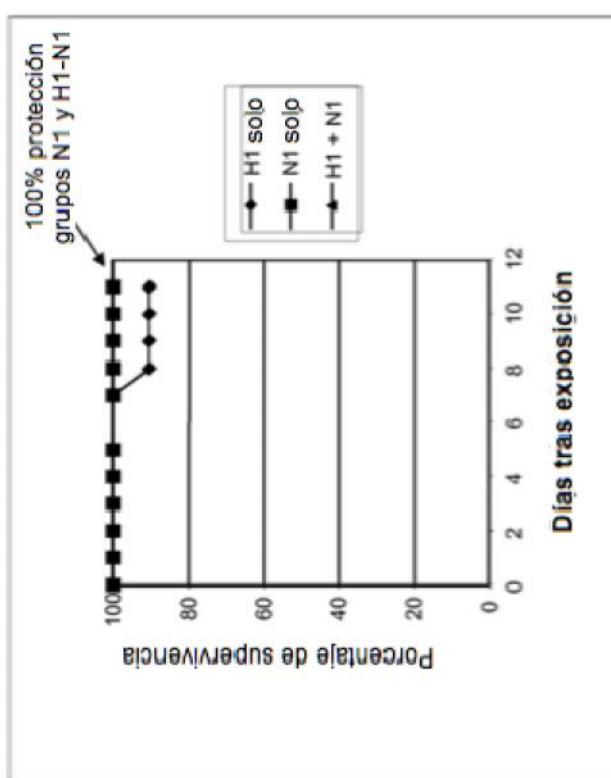


Figura 22. Inmunización con partículas de replicón VEE/SIN que expresa FLU HA y/o NA proporciona protección de exposición intranasal FLU



10^4 dosis de vacuna de partícula de replicón IU

Figura 23. Inmunización de hámsters con partículas de replicón VEE/SIN-HN por rutas IM o IN proporciona protección completa de exposición intranasal PIV3

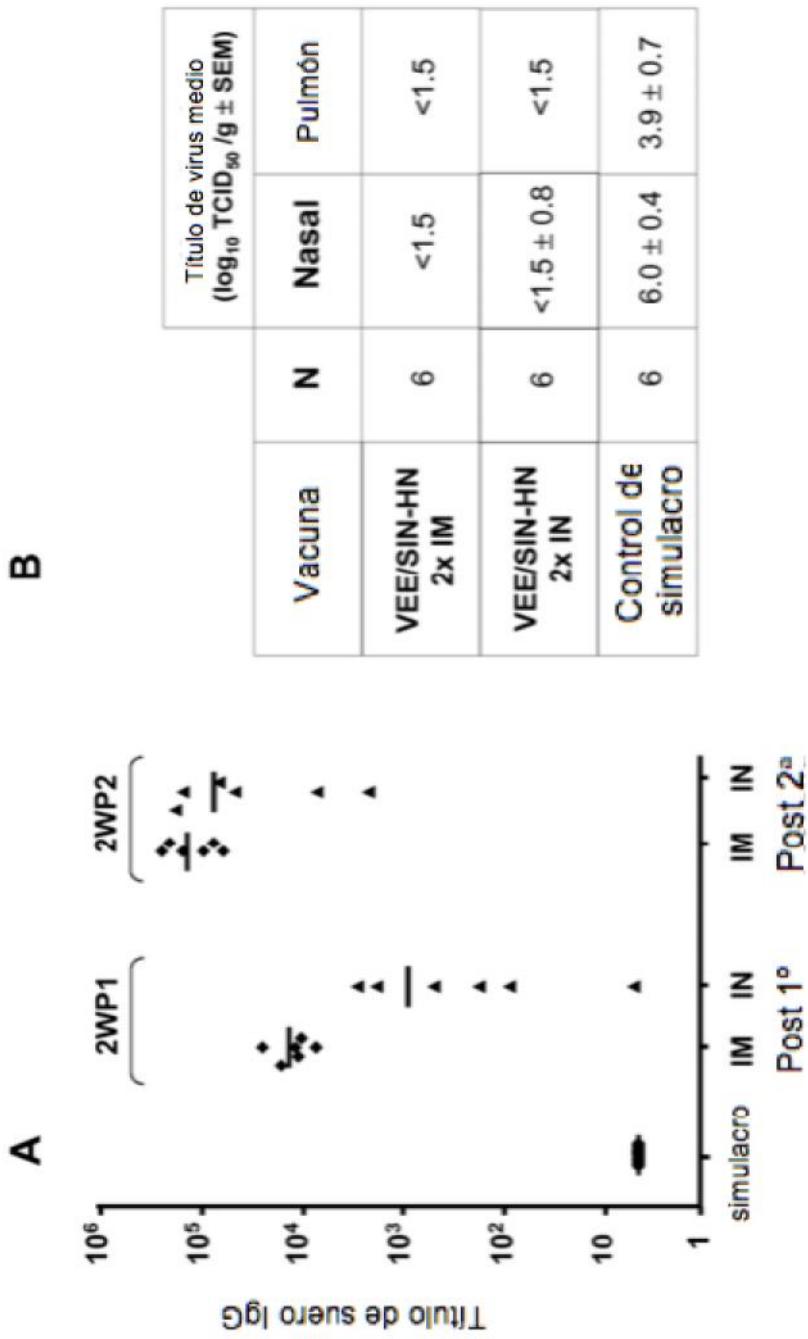


Figura 24. Expresión de PIV3 HN y glicoproteínas RSV F utilizando estrategias de vacuna de combinación a base replicón de antívirus

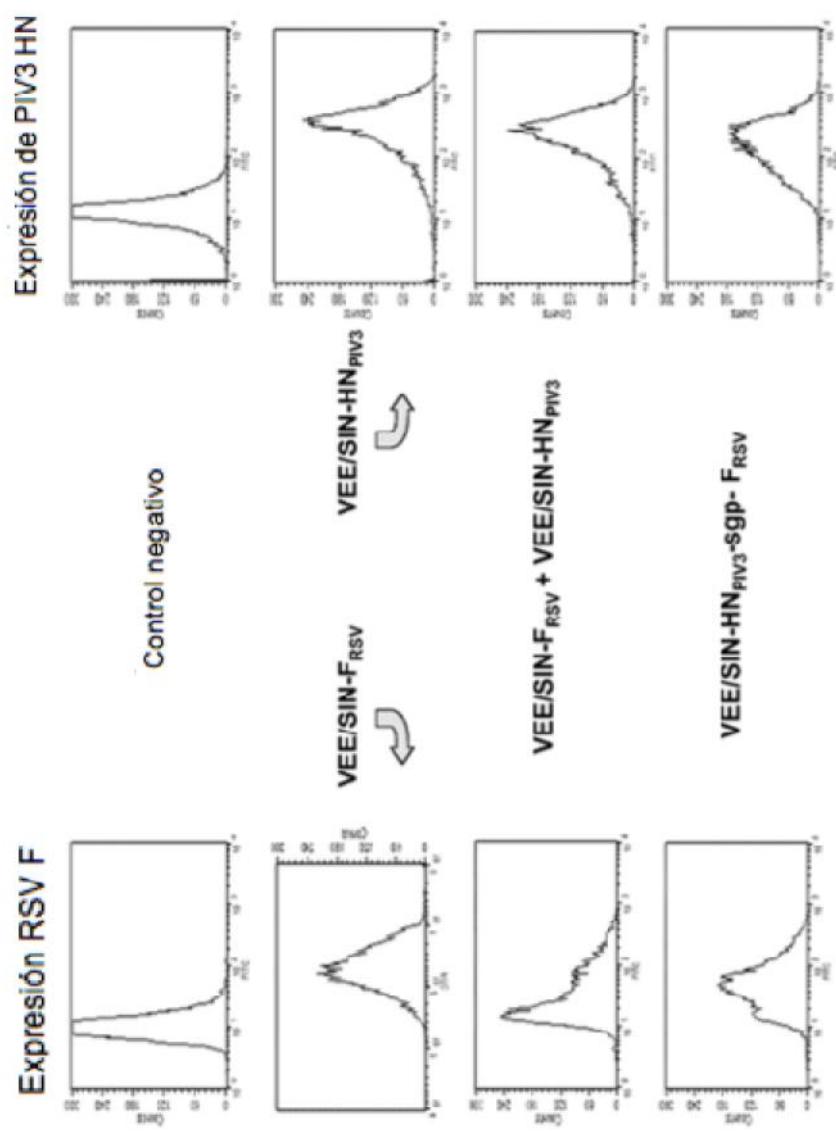
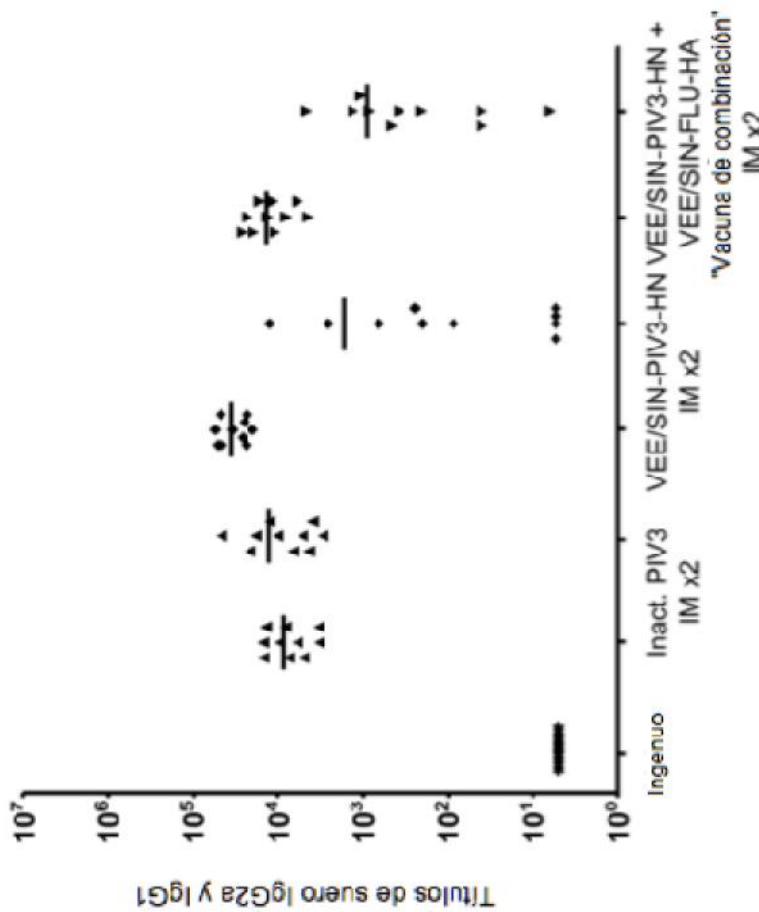


Figura 25. Respuestas de anticuerpo de suero específicas a PIV de PIV inactivado o vacunas de combinación PIV y PIV/FLU de partícula de replicón de antivírus



Titulos de anticuerpo de suero 2WP2 específicos a isotipo anti-PIV3