

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 652 443**

51 Int. Cl.:

C12N 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.09.2010 PCT/GB2010/001807**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011 WO11048353**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2010 E 10777059 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2491118**

54 Título: **Construcción para la producción de cápsidas vacías de picornavirus**

30 Prioridad:

20.10.2009 GB 0918375

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

02.02.2018

73 Titular/es:

**THE PIRBRIGHT INSTITUTE (100.0%)
Ash Road, Pirbright
Woking, Surrey GU24 0NF, GB**

72 Inventor/es:

**CHARLESTON, BRYAN y
JONES, IAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 652 443 T3

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

DESCRIPCIÓN

Construcción para la producción de cápsides vacías de picornavirus

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una construcción que, cuando se expresa en una célula hospedadora, es capaz de producir cápsides vacías de virus, en particular cápsides del virus de la enfermedad de la fiebre aftosa (FMDV del inglés *Foot and Mouth Disease Virus*). La presente invención también se refiere a vectores y a células hospedadoras que comprenden dichas construcciones.

Antecedentes de la invención

15 Enfermedad de la fiebre aftosa (FMD del inglés *Foot and Mouth Disease*)

La FMD es una enfermedad muy contagiosa y económicamente devastadora de los animales de pezuña hendida (*Artiodactyla*), que afecta a rumiantes domesticados, a cerdos y a diversas especies naturales.

La FMD está muy distribuida en todo el mundo. Las regiones desarrolladas, tales como los continentes de Norteamérica y Centroamérica y la Antártida, y países como Australia y Nueva Zelanda, son indemnes, mientras que la FMD es endémica en muchos países en desarrollo como los de África subsahariana, Oriente Medio, Asia meridional sudeste Asiático y Sudamérica. También hay algunas áreas en el mundo que normalmente son indemnes, tal como Europa, donde la FMD fue erradicada en 1989 y donde la vacunación se suspendió a partir de 1991. Sin embargo, ha habido incursiones ocasionales de la enfermedad como la epidemia de 2001 en Reino Unido/República de Irlanda/Francia/Países Bajos debidas a la cepa panasiática del tipo O (Knowles et al., (2001) Veterinary Record. 148. 258-259) y el brote en Reino Unido en 2007 del serotipo O1 BFS/1967.

El agente causante de la FMD es el virus de la fiebre aftosa (FMDV), un virus de ARN bicatenario, de sentido positivo, de la familia *Picornaviridae*. El FMDV existe como siete serotipos antigénicamente distintos, en particular A, O, C, Asia 1 y Territorios de Sudáfrica (SAT) 1, 2 y 3, con numerosos subtipos dentro de cada serotipo.

La traducción del ARN monocatenario produce una poliproteína que es procesada posteriormente por las proteasas codificadas por el virus para producir las proteínas estructurales y no estructurales requeridas para el ensamblaje y la replicación del virus. La propia proteasa Líder (L) se escinde en *cis* o en *trans* en su extremo C desde el precursor de la cápside P1-2A. La propia proteasa 2A se escinde en su extremo C para liberar P1-2A a partir de P2. El procesamiento de P1-2A lo efectúa la proteasa 3C para producir las proteínas 1AB (también conocidas como VP0), 1C (VP3) y 1D (VP1) de la cápside. En el virión, la escisión de 1AB ocurre para producir 1A (VP4) y 1B (VP2).

40 Vacunas contra el FMDV

Las vacunas convencionales contra la FMD consisten en viriones completos de virus que se han inactivado químicamente, normalmente utilizando una aziridina tal como etilenimina binaria (BEI).

Las vacunas contra virus completos inactivados desempeñan una función clave en campañas para controlar y erradicar la FMD. Sin embargo, las vacunas producidas a partir de cultivo de tejido vírico están asociadas al riesgo de liberación del virus durante la producción de la vacuna. También existe el riesgo de una inactivación inapropiada del virus que tiene el potencial de conducir a brotes de la FMD relacionados con la vacuna.

Para reducir estos riesgos, se ha considerado la posibilidad de utilizar partículas de tipo cápside vacías de FMDV. Dichas partículas comprenden las proteínas estructurales del FMDV pero no pueden replicarse y no son infecciosas porque no tienen el genoma del ARN. Como la estructura externa de las cápsides vacías debería ser la misma que la del virus tipo silvestre, las cápsides vacías deberían ser antigénicas e inmunogénicas de forma similar.

Se han hecho varios intentos de producir partículas de cápsides de FMD vacías, pero ha habido problemas recurrentes asociados a la producción y a estabilidad del producto.

Se ha utilizado un sistema de expresión del virus variolovacunal para expresar un casete P1-2A-3C (Abrams et al (1995) J. Gen Virol. 76:3089-3098). Se descubrió que la expresión constitutiva del casete fue infructuosa pero los recombinantes de vv/FMDV pudieron aislarse cuando el casete se colocó bajo el control del promotor del bacteriófago T7. Sin embargo, dicho sistema no pudo utilizarse para la expresión prolongada de cápsides vacías porque con el paso del tiempo, la toxicidad del casete P1-2A-3C prevalecería. Existe también la cuestión de que se podría necesitar la expresión constante de Pol T7 para dirigir la producción del P1-2A-3C. Se puede conseguir esto a pequeña escala en cultivo tisular, pero no sería posible extrapolar esto a una escala de fabricación. Además, los productos producidos en un sistema variolovacunal no son viables desde un punto de vista comercial para una aplicación veterinaria o médica.

Li et al (2008) (PLoS ONE 28:3(5) e2273) divulgan la expresión de proteínas de cápsides del virus FMDV en un sistema de expresión de baculovirus del gusano de seda. Los virus recombinantes que expresan las regiones codificantes intactas de P1-2A y 3C se utilizaron para inocular gusanos de seda y posteriormente la hemolinfa recogida de los gusanos de seda moribundos. Se demostró que la preparación de estos "antígenos expresados" causó una respuesta de anticuerpos dirigida contra el FMDV en ganado bovino. Sin embargo, la naturaleza de los "antígenos expresados" es totalmente ambigua, y los autores parecen asumir que es una "vacuna subunitaria" en lugar de una cápside vacía.

Cao et al ((2009) Veterinary Microbiology 137:10-17) describen un sistema de baculovirus recombinante que expresa simultáneamente los genes de las proteínas P12A y 3C del FMDV de promotores individuales. Mediante análisis de transferencia de Western se demostró que las proteínas de cápsides se procesaron hasta cierto punto por la proteasa 3C y que las partículas de cápsides vacías podrían observarse por microscopía inmunoelectrónica. La inmunización con un extracto en bruto de una cápside vacía produjo una respuesta inmunitaria, pero los niveles de anticuerpos específicos contra el FMDV y de anticuerpos neutralizantes fueron inferiores a los de la vacuna inactivada convencional. Se predice que esto se debe a niveles inferiores de partículas de cápsides vacías. Se concluye que se necesitan estudios adicionales para mejorar la cantidad de expresión de proteínas y ensamblaje de cápsides vacías en células de insectos.

Cardno et al. (RNA (2009),15:1614-1621) describen que los mecanismos de recodificación son episodios de síntesis de proteínas programados utilizados habitualmente por los virus aunque solo muy raramente en células para la expresión celular de genes. Por ejemplo, el VIH-1 tiene una dependencia absoluta en el desplazamiento de la fase de lectura para producir la proporción correcta de proteínas clave críticas para la infectividad. Cardno *et al.* describen un ensayo bifluoróforo basado en células capaz de medir con precisión pequeños cambios de recodificación (<0,1%) con un alto factor Z' en formatos de 24 o 96 pocillos que pueden ampliarse a 384 pocillos.

Lewis et al. (Journal of Virology; 1991; 65(12); 6572-6580) describen que los plásmidos que contienen el precursor estructural de proteínas del FMDV (PI) y los genes de la proteasa 3C o el gen P1 solo se expresaron en *Escherichia coli*. También se generó un baculovirus recombinante que contenía el gen P1 y se expresado en células de *Spodoptera frugiperda*. Lewis *et al.* describen que la expresión de los genes P1 y 3C en *E. coli* producía la síntesis eficaz y el procesamiento o el precursor estructural de proteínas y ensamblaje en cápsides vacías de 70S.

Existe por lo tanto la necesidad de un método mejorado para producir cápsides víricas vacías que produzcan un producto estable, inmunogénico a un rendimiento razonable.

Resumen de aspectos de la invención

Los presentes inventores han descubierto de forma sorprendente que la razón del bajo rendimiento que históricamente se había asociado a la producción de cápsides vacías del FMDV es que el nivel de proteasa 3C es demasiado alto en la célula hospedadora, que ocasiona toxicidad. Para producir partículas de cápsides vacías a alto rendimiento, es necesario equilibrar la expresión y/o actividad de la proteasa 3C, de modo que se exprese/active lo suficiente para escindir el precursor de la proteína de la cápside, pero que no se exprese/active a niveles que induzcan toxicidad en la célula hospedadora.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una construcción que, cuando se expresa en una célula hospedadora, es capaz de producir cápsides vacías de virus, comprendiendo la construcción:

- (i) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína precursora de cápside P1;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteasa 3C capaz de escindir la proteína precursora de cápside del picornavirus en la que la proteasa incluye una mutación de Cys142 que reduce su actividad de escisión de la proteína precursora de cápside; y
- (iii) un elemento de control que controla la expresión de la proteasa

de tal manera que, cuando la construcción está presente en la célula hospedadora, el elemento de control provoca que la proteasa se exprese a un nivel suficiente para escindir la proteína precursora de cápside, pero no suficiente para inducir una toxicidad significativa en la célula hospedadora, donde el elemento de control es un sitio de desplazamiento de la fase de lectura del retrovirus.

El elemento de control puede estar en el sitio de desplazamiento de la fase de lectura del VIH-1. El sitio de desplazamiento de la fase de lectura del VIH-1 provoca un desplazamiento de la fase de lectura en aproximadamente el 5% de los ARNm traducidos.

El sitio de desplazamiento de la fase de lectura puede situarse entre la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína precursora de cápside y la secuencia de nucleótidos que codifica la proteasa, de tal manera que cuando se traduce la construcción:

- (1) si el ribosoma no experimenta un desplazamiento de la fase de lectura produce un producto truncado (que comprende la proteína precursora de cápside pero no la proteasa); pero
 (2) si el ribosoma sí experimenta un desplazamiento de la fase de lectura, se traducen tanto la proteína precursora de cápside como la proteasa.

5 En la construcción del primer aspecto de la invención, la actividad de la proteasa se reduce por una mutación en Cys142 que reduce su actividad de escisión de la proteína precursora de cápside.

10 La proteasa (por ejemplo, la proteasa mutante) puede tener aproximadamente una actividad de escisión de la proteína precursora de cápside 3 veces inferior que la proteasa 3C de tipo silvestre.

Las cápsides vacías producidas por una célula hospedadora que comprenden una construcción según el primer aspecto de la invención, pueden ser cápsides del Virus de la Enfermedad de la fiebre aftosa (FMDV).

15 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende una construcción según el primer aspecto de la invención. El vector puede ser, por ejemplo, un vector de transferencia de baculovirus; un vector de ADN, un plásmido o un vector vírico.

20 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una célula hospedadora que comprende una construcción según el primer aspecto de la invención. En una primera realización, la célula hospedadora puede ser capaz de producir un vector de acuerdo con el segundo aspecto de la invención. En una segunda realización, la célula hospedadora puede ser capaz de producir cápsides vacías de virus.

25 La célula hospedadora puede ser, por ejemplo, una célula de insecto o una célula de mamífero.

Aspectos adicionales de la invención se refieren a:

- 30 (i) un método para producir cápsides vacías de virus por la expresión de una construcción según el primer aspecto de la invención en una célula hospedadora y la recogida de cápsides vacías de virus producidas por la célula hospedadora; y
 (ii) un método para la producción de una vacuna, produciendo cápsides vacías de virus mediante dicho método e incorporando las cápsides vacías de virus en una vacuna.

En el presente documento también se describe;

- 35 (i) un método para tratar y/o prevenir una enfermedad en un sujeto, mediante la expresión de una construcción según el primer aspecto de la invención en el sujeto de tal manera que las cápsides vacías se producen *in vivo*;
 (ii) una construcción según el primer aspecto de la invención o un vector según el segundo aspecto de la invención para su uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad;
 40 (iii) el uso de una construcción según el primer aspecto de la invención, o de un vector según el segundo aspecto de la invención, en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad;
 (iv) el uso de un elemento de control retroviral para controlar la expresión de una proteína picornavírica; y
 (v) una construcción que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína picornavírica bajo el control de un elemento de control retroviral.

45 Las vacunas basadas en "cápsides vacías" son ventajosas con respecto a las vacunas contra patógenos totalmente inactivadas tradicionales (por ejemplo, para la FMD) porque no requieren instalaciones de contención de alta seguridad para su fabricación, disminuyendo así cualquier riesgo de "escape" de virus. Son también no infecciosas, fáciles de manipular y (en vista de la presente invención) fáciles y económicas de preparar.

50 Descripción de las figuras

Figura 1 - Vector de expresión pOPINE5949-FS. El vector es un derivado del vector comercial pTriEx1.1 (EMD Sciences) pero se ha modificado para la clonación continua. Se muestran los rasgos destacados del vector y sitios de los sitios de restricción diagnósticos. Una etapa clave necesaria para la expresión satisfactoria de cápsides vacías de FMDV es la introducción de una secuencia que codifica el sitio de desplazamiento de la fase de lectura del VIH-1 más allá de la región codificante de 3C entre los sitios de restricción únicos NotI y Bsu36I. Como resultado, todos los ARNm que se originan del promotor p10 o CMV traducen la proteína precursora P1 pero solo un subconjunto traduce la proteasa 3C. Cuando se utiliza para formar un baculovirus recombinante, la secuencia entre la ORF603 en sentido dextrógiro hacia la ORF1629 se recombina con el genoma del virus. El promotor P10 se desactiva después como parte del ciclo infeccioso del baculovirus produciendo el producto recombinante en la célula infectada.

65 Figura 2 - Comparación de los niveles de expresión entre baculovirus recombinantes que codifican P1-2A-3B3-3C (recorrido derecho) o P1-2A-3B3-3C_{163S} (recorrido izquierdo). La inactivación de la actividad 3C rescata una síntesis abundante de P1.

Figura 3 - La secuencia utilizada para producir un desplazamiento de la fase de lectura en la unión P1-3C. Los rasgos clave son una ejecución de uracilos (subrayado) donde se produce un deslizamiento seguido de un pseudonudo que provoca que el ribosoma se detenga favoreciendo así el deslizamiento.

5 Figura 4 - Introducción de la secuencia de desplazamiento de la fase de lectura del VIH-1 en la secuencia del FMDV. La fase de lectura de P1 es la superior de las dos y la inserción produce el truncamiento del producto traducido en el codón de terminación marcado en rojo. El desplazamiento de la fase de lectura A -1 al principio de la secuencia insertada (recuadro naranja) produce la corrección de la fase de lectura para incluir la traducción de 3C (fase inferior).

10 Figura 5 - Mediciones de actividad *in vitro* de la proteasa 3C mutada en el resto 142. Obsérvese que tanto 142T como 142S tienen actividad reducida cuando se compara con la secuencia parental.

15 Figura 6 - Filogenia de picornavirus. La familia estrechamente relacionada comparte una estrategia de codificación y un ciclo de replicación común; lo que se ha observado en virus bien estudiados, tales como el poliovirus (PV) y el virus de la enfermedad de la fiebre aftosa (FMDV), ha sido válido para otros miembros. Una filogenia y un análisis completo puede encontrarse en: Hughes AL. (2004) Phylogeny of the Picornaviridae and differential evolutionary divergence of picornavirus proteins. *Infect Genet Evol.* 4:143-52.

20 Figura 7 - El mapa lineal del casete de expresión en la Figura 1 y sus posibles productos de traducción. Los niveles de traducción relativos sugeridos para el producto de P1 y P1-2A-3B-FS-3C se han extraído de la bibliografía y no se han determinado empíricamente.

25 Figura 8 - Toxicidad de la proteasa 3C. Células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes que expresan el P1 de FMDV acoplado a 3C. En A, el recorrido 1 es un mutante en Cys del sitio activo en el resto 163 y se aprecia la síntesis abundante de la proteína de fusión P1-3C que se degrada espontáneamente a P1. El recorrido 2 es la proteasa de tipo silvestre; se aprecia muy poca síntesis de P1 de la proteína de la cápside madura VP1. En B, se comparan virus recombinantes que expresan P1 (recorrido 1) y P1 acoplado a 3C atenuado (recorrido 2). Ahora, la síntesis de alto nivel se mantiene y el precursor P1 se convierte por estequiometría a la proteína de cápside madura VP1. Los lisados celulares se resolvieron con SDS-PAGE al 10% y los análisis de transferencia de Western se exploraron con un antisuero de FMDV polivalente en el que la mayor parte de la reactividad es contra VP1. Las cantidades molares de VP0 y VP3 están también presentes pero no se revelan con este suero.

35 Figura 9 - Ensamblaje de cápsides vacías de FMDV. Análisis del gradiente de sacarosa de los productos de expresión a partir de células de insecto infectadas por baculovirus recombinantes donde se logró la modificación de la actividad de la proteasa 3C. Algún precursor P1 no procesado, probablemente agregado, está presente en la parte inferior del gradiente mientras que el producto de escisión de VP1 forma un fuerte pico amplio en las fracciones de sacarosa al 35-45%. La posición en el gradiente es la que se esperaba de una partícula ensamblada y de un antígeno insoluble.

40 Figura 10 - Visualización de cápsides vacías de FMDV de serotipo A producidas por la expresión de baculovirus. Las fracciones pico de un gradiente de sacarosa se agruparon y concentraron antes de absorberse en rejillas Formvar recubiertas con carbono. Se observa una cantidad de partículas con un diámetro de 25 nm (indicado con dos flechas). Obsérvese la mancha dentro de la partícula que muestra que están vacías. Con una flecha roja se indica una partícula que muestra una definición angular particularmente buena en consonancia con una estructura icosaédrica.

50 Figura 11 - Visualización de cápsides vacías de FMDV de serotipo O producidas por la expresión de baculovirus.

Figura 12 - Gráfico que demuestra la inducción de anticuerpos específicos en cobayas en respuesta a la inmunización con cápsides sintéticas. Los títulos de anticuerpos se midieron utilizando (A) una prueba de neutralización de virus y (B) un ELISA bloqueador de fase líquida. La inmunización de las cobayas con cápsides sintéticas de serotipo A produce la inducción de títulos de anticuerpos en consonancia con niveles que demostraron ser protectores en estudios anteriores.

Descripción detallada

Construcción

60 En un primer aspecto de la invención, la presente invención proporciona una construcción que comprende

- 65 (i) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína precursora de cápside P1;
- (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteasa 3C capaz de escindir la proteína precursora de cápside del picornavirus en la que la proteasa incluye una mutación en Cys142 que reduce su actividad de escisión de la proteína precursora de cápside; y

(iii) un elemento de control que controla la expresión de la proteasa, donde el elemento de control es un sitio de desplazamiento de la fase de lectura del retrovirus.

5 La expresión "secuencia de nucleótidos" incluye una secuencia de ARN o de ADN. Esta secuencia puede ser monocatenaria o bicatenaria. Puede ser, por ejemplo, genómica, recombinante, ARNm o ADNc.

10 La construcción puede ser una secuencia de nucleótidos que comprende las secuencias de nucleótidos (i) y (ii), posiblemente de una manera contagiosa. Entre las secuencias de nucleótidos (i) y (ii) puede haber una sección de secuencia. El elemento de control puede estar presente en esta sección de la secuencia, de tal manera que controla la expresión de la proteasa pero no controla o afecta a la expresión de la proteína precursora de cápside.

La construcción puede estar presente como parte de un plásmido, vector de transferencia o genoma de célula hospedadora (véase más adelante).

15 Elemento de control

La construcción del primer aspecto de la invención comprende un elemento de control que controla la expresión de la proteasa. El elemento de control controla al menos parcialmente la traducción de la proteasa.

20 De manera específica, el elemento de control provoca que la proteasa se exprese a un nivel suficiente para escindir la proteína precursora de cápside, pero no suficiente para inducir una toxicidad significativa en la célula hospedadora.

25 La escisión de la proteína precursora de cápside puede analizarse utilizando técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, extractos de proteínas recombinantes de células hospedadoras pueden separarse por electroforesis en gel y las proteínas separadas pueden transferirse a una membrana de nitrocelulosa para análisis de transferencia de Western. El análisis de transferencia de Western con un anticuerpo antivírico revelaría el grado y la extensión de la escisión mediada por proteasa.

30 Por ejemplo, para FMDV, la proteína precursora de cápside sin procesar (P1-P2A) aparecería como una banda de 81 kDa, y la escisión puede producir VP31 (47 kDa), VP3 (24 kDa) y/o VP1 (24 kDa).

35 La escisión de la proteína precursora de cápside también puede deducirse a través de la producción de cápsides vacías (véase más adelante).

40 El grado de citotoxicidad en la célula hospedadora inducido por la proteasa también puede analizarse utilizando técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, puede utilizarse exclusión con azul de tripano, por ejemplo, mezclando volúmenes equivalentes de azul de tripano al 0,4 % con células y definiendo el nivel de viabilidad medido con el contador celular automático Countess (Invitrogen).

45 El nivel de toxicidad no se considera "significativo" si es inferior al 10 %, menos del 5 % o menos del 2 % de las células hospedadoras se vuelven inviables por la proteasa. El nivel de toxicidad no se considera "significativo" si la célula hospedadora es capaz de expresar la proteína precursora de cápside al 80, 90 o 95 % del nivel que se alcanzaría en ausencia de la coexpresión de la proteína 3C (ignorando el efecto de la escisión de la proteína precursora de cápside por la proteasa).

El elemento de control reduce la expresión de la proteasa 3C, comparado con el nivel de expresión que se obtendría si el elemento de control estuviese ausente.

50 El elemento de control es un sitio de desplazamiento de la fase de lectura que provoca que el ribosoma traductor salte (o repita) al menos una base en un porcentaje de casos cuando lee un ARNm. Durante el desplazamiento de fase de lectura, los ribosomas traductores pueden inducirse a deslizar un nucleótido hacia adelante o hacia atrás en un punto distinto en el transcrito, continuando después la síntesis de proteínas en la fase de lectura +1 o -1, respectivamente.

55 Las señales de desplazamiento de la fase de lectura ribosómicas -1 programadas se caracterizan bien y se han divulgado también algunos eventos de desplazamiento de la fase de lectura -1 bacterianos. Diversos virus que infectan células eucariotas utilizan desplazamientos de fase de lectura ribosómicos -1 programados, lo que demuestra que los elementos *cis* implicados en el proceso de desplazamiento de la fase de lectura son operativos en eucariotas. En sistemas víricos, la eficacia del desplazamiento de la fase de lectura es un determinante esencial de la estequiometría de los productos proteicos víricos sintetizados, que debe mantenerse para la propagación eficaz del virus.

60 El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) -1 utiliza el desplazamiento de la fase de lectura ribosómico para producir la proporción requerida de poliproteínas Gag y Gag-Pol. Se considera que la estructura tallo-bucle de la señal de desplazamiento de la fase de lectura obstaculiza al ribosoma y causa el deslizamiento en la dirección 5',

esto provoca que el desplazamiento de la fase de lectura -1 y la traducción continúe después en la nueva fase de lectura (véase la Figura 3).

5 El elemento de control puede provocar un desplazamiento de la fase de lectura entre el 1-20 %, el 1-10 %, el 3-7 % o aproximadamente el 5 % de los ARNm traducidos.

10 La secuencia de desplazamiento de la fase de lectura puede comprender una ejecución de aproximadamente 6 uracilos, donde se produce el deslizamiento, seguido de una secuencia capaz de formar un pseudonudo que provoca que el ribosoma se detenga, lo que promueve el deslizamiento.

El elemento de control puede estar cadena arriba de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteasa y cadena abajo de la secuencia que codifica la proteína precursora de cápside.

15 Cápsides vacías

Una "cápside vacía" es una entidad que comprende la cubierta proteica de un virus pero carece del genoma de ARN o ADN. Una cápside vacía puede ser antigénica e inmunogénica al igual que la vacuna de tipo silvestre porque conserva los mismos epítomos estructurales, pero podría no producir infección, debido a la ausencia de genoma.

20 La producción de una cápside vacía puede investigarse o verificarse utilizando técnicas conocidas en la materia, tales como la centrifugación por densidad de sacarosa o la microscopía electrónica (Abrams *et al* (1995) como se ha mencionado anteriormente).

25 Para averiguar si se conserva la antigenicidad de la cápside vacía, pueden utilizarse anticuerpos monoclonales específicos para epítomos conformacionales en el virus de tipo silvestre.

Proteasa

30 Tal como se ha mencionado anteriormente, para los picornavirus, tal como el FMDV, el procesamiento proteolítico del precursor P1 en VP0 (VP2 más VP4), VP3 y VP1 se produce mediante la proteasa 3C vírica o su precursor 3CD.

A continuación se ofrece la secuencia de la proteasa 3C de tipo silvestre de FMDV de una cepa A de tipo FMDV:

35 1 sgapptdlqk mvmgntkpve lildgktvai ccatgvfgta ylvprhfae kydkimldgr
61tmtdsdyrvf efeikvkgqd mlsdaalmvl hrgrnrvidit khfrdvarkm kgtpvvgvin
121 nadvgrlifs gealtykdiv vcmdgdtmpg lfaykaatka gycggavlak dgaetfivgt
181 hsagngvgvy cscvsrsmf kmkahidpep hhe

40 La estructura cristalina de la proteasa 3C se ha aclarado y se ha llevado a cabo un análisis mutagénico para proporcionar información sobre el sitio activo (Sweeney *et al* (2007) *J. Virol.* 81:115-124).

La construcción del primer aspecto de la invención incluye una mutación en Cys142 que reduce la actividad de escisión de la proteína precursora de cápside de la proteasa 3C.

45 Las mutaciones pueden estar, por ejemplo, en el sitio activo de la proteasa. Se piensa que existe una tríada catalítica en el sitio activo compuesta por los restos 163, 46 y 84. La mutación puede implicar la delección o sustitución de uno o más de estos restos.

50 La mutación podría reducir, pero no suprimir, la actividad de escisión de la proteína precursora de cápside.

La estructura cristalina de la proteasa 3C reveló que hay un lazo β que se pliega sobre la hendidura de unión al péptido y contribuye al reconocimiento del sustrato (Sweeney *et al* (2007) como se ha mencionado anteriormente). La mutación puede estar, por ejemplo, en el lazo β (restos 138 a 150). La mutación puede ser, por ejemplo, una sustitución en el resto 142. La mutación puede ser una mutación C142V, C142A o C142T. La mutación puede ser una mutación C142T.

55 La mutación puede reducir la constante de especificidad para la enzima de entre 3 veces y 2 veces, o entre 3 veces y 1,5 veces. Por ejemplo, si la constante de especificidad para la enzima de tipo silvestre es de 990 k_{cat}/Km , la constante de especificidad para la enzima mutante puede ser entre 495 y 330 o entre 660 y 330 k_{cat}/Km .

60 La proteasa mutante puede tener el 10-50 %, el 20-40 % o aproximadamente el 30 % de la actividad de escisión de la proteína precursora de cápside en comparación con la proteasa de tipo silvestre.

Proteína precursora de cápside

65 La proteína precursora de cápside es (para picornavirus) P1, que se escinde por la proteasa 3C en VP0, VP3 y VP1.

La proteína precursora de cápside puede ser P1-2A. La propia proteasa 2A se escinde en su extremo C para liberar P1-2A a partir de P2.

5 La proteína precursora de cápside puede ser escindible por la proteasa para formar (parte de una) cápside vacía. La proteína precursora puede comprender todos los tipos de proteína necesarios para formar una cápside vacía, que se pueden producir por la escisión de la proteasa.

Vector

10 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un vector que comprende una construcción según el primer aspecto de la invención.

El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido o un vector de transferencia de baculovirus, un vector de ADN o un vector vírico.

15 El vector puede ser capaz de transferir la construcción a una célula hospedadora.

El vector puede ser capaz de transferir la construcción a una vegetal, de insecto, o de animal.

20 El sistema de expresión de baculovirus se utiliza mucho para la producción de virus y partículas de tipo virus.

El vector de la presente invención puede ser, por ejemplo, uno o varios plásmidos de transferencia, utilizados para transformar células (por ejemplo, células de *E. coli*) en las que se propaga el vector lanzadera de baculovirus.

25 La construcción del primer aspecto de la invención puede ser o comprender ADN de baculovirus recombinante generado por transposición específica de sitio del ADN del vector de transferencia en un vector lanzadera de baculovirus (bácmido). Este ADN puede transfectarse en células de insecto para producir baculovirus recombinante.

30 El vector de la presente invención puede ser el baculovirus recombinante resultante.

Otros vectores víricos incluyen, pero sin limitación, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados (AAV, *adeno-associated viral*), y vectores herpesvíricos, vectores retrovíricos (incluidos los vectores lentivíricos).

35 Los retrovirus se utilizan habitualmente en estrategias de terapia génica. Los retrovirus recombinantes, tales como el virus de la leucemia murina de Moloney, tienen la capacidad de integrarse en el genoma hospedador en una forma estable. Estos contienen una transcriptasa inversa que permite la integración en el genoma hospedador. En diversos ensayos clínicos, tal como el ensayo SCID-X1, se han utilizado vectores retrovíricos aprobados por la FDA.

40 El inconveniente principal del uso de retrovirus, tal como el retrovirus de Moloney, implica la necesidad de que las células puedan dividirse de forma activa para la transducción. Como resultado, células tales como las neuronas, son muy resistentes a la infección y transducción por retrovirus.

45 Los lentivirus son una subclase de retrovirus. Se han adaptado recientemente como vehículos (vectores) de suministro de genes debido a su capacidad para integrarse en el genoma de células no divisibles. El genoma vírico en forma de ARN se retrotranscribe cuando el virus se introduce en la célula para producir ADN, que después se inserta en el genoma en una posición aleatoria por la enzima integrasa vírica. El vector, ahora denominado provirus, permanece en el genoma y se transfiere a la progenie de la célula cuando se divide.

50 Por razones de seguridad, los vectores lentivíricos nunca llevan los genes necesarios para su replicación. Para producir un lentivirus, varios plásmidos se transfectan en una línea celular denominada de empaquetamiento, comúnmente HEK 293. Uno o más plásmidos, generalmente en referencia a los plásmidos de empaquetamiento, codifican las proteínas de viriones, tales como la cápside y la transcriptasa inversa. Otro plásmido contiene el material genético a suministrar por el vector. El plásmido se transcribe para producir el genoma vírico de ARN monocatenario y se caracteriza por la presencia de la secuencia ψ (psi). Esta secuencia se utiliza para empaquetar el

55 genoma en el virión.

60 Al contrario de lo que ocurre en los lentivirus, el ADN adenovírico no se integra en el genoma y no se replica durante la división celular. Sus aplicaciones principales son en la terapia génica y en la vacunación. Dado que los seres humanos entran normalmente en contacto con los adenovirus, que causan infecciones respiratorias, gastrointestinales y oculares, estos desencadenan una respuesta inmunitaria rápida con consecuencias posiblemente peligrosas. Para superar este problema, los científicos están investigando actualmente adenovirus contra los que los seres humanos no tienen inmunidad.

65 El virus adenoasociado (AAV) es un virus pequeño que infecta a los seres humanos y a algunas otras especies de primates. Actualmente no se sabe si el AAV causa enfermedad y, en consecuencia, el virus produce una respuesta inmunitaria muy leve. El AAV puede infectar a células tanto divisibles como no divisibles y puede incorporar su

genoma en el de la célula hospedadora. Estos rasgos hacen que el AVV sea un candidato muy atractivo para crear vectores víricos para la terapia génica.

Célula hospedadora

5 La presente invención también proporciona una célula hospedadora que comprende una construcción según el primer aspecto de la invención.

10 La célula hospedadora puede ser capaz de producir un vector (tal como un vector vírico) según el segundo aspecto de la invención.

La célula hospedadora puede ser una célula de empaquetamiento o una célula productora, capaz de producir un vector vírico.

15 La célula hospedadora puede ser una célula de insecto Sf9, capaz de producir un baculovirus recombinante según el segundo aspecto de la invención.

La célula hospedadora puede ser capaz de producir cápsides vacías de virus.

20 La célula hospedadora puede ser una célula bacteriana, de insecto, vegetal o animal.

Métodos de producción

25 La presente invención también proporciona un método para la producción de cápsides vacías de virus que comprende las siguientes etapas:

- (i) la expresión de una construcción según el primer aspecto de la invención en una célula hospedadora; y
- (ii) la recogida de las cápsides vacías de virus producidas por la célula hospedadora.

30 La construcción de la invención puede introducirse en la célula hospedadora, por ejemplo, mediante, transfección o transducción con un vector, según el segundo aspecto de la invención.

Si las cápsides vacías de virus se expresan fuera de la célula hospedadora, pueden recogerse del sobrenadante.

35 Si las cápsides vacías de virus se expresan dentro de la célula hospedadora, pueden recogerse, por ejemplo, mediante,

- (i) lisis de las células hospedadoras (por ejemplo, por congelación-descongelación); y opcionalmente
- (ii) concentradas (por ejemplo, por precipitación en PEG), y/o
- (iii) purificación.

40 La presente invención también proporciona un método para la producción de una vacuna, que comprende la etapa de producir cápsides vacías de virus mediante dicho método e incorporar las cápsides vacías de virus en una vacuna.

45 La vacuna también puede comprender un diluyente, adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Virus

50 La presente invención se refiere a la producción de cápsides vacías de un picornavirus.

En la Tabla 1 se proporcionan ejemplos de géneros especies y serotipos de picornavirus.

Tabla 1

Género	Especie (* significa tipo de especie)	Serotipos
Enterovirus	<i>Enterovirus bovino</i>	dos tipos: enterovirus bovino (BEV) 1 y BEV-2
	<i>Enterovirus A humano</i>	21 tipos incluidos algunos coxsackievirus A y enterovirus
	<i>Enterovirus B humano</i>	57 tipos incluidos los enterovirus, coxsackievirus B, echovirus y virus de la enfermedad vesicular porcina
	<i>Enterovirus C humano</i>	14 tipos incluidos algunos coxsackievirus A y enterovirus
	<i>Enterovirus D humano</i>	tres tipos: EV-68, EV-70, EV-94

Género	Especie (* significa tipo de especie)	Serotipos
	<i>Poliovirus</i> *	tres tipos: poliovirus (PV) 1, PV-2 y PV-3
	<i>Enterovirus A porcino</i>	un tipo: enterovirus porcino (PEV) 8
	<i>Enterovirus B porcino</i>	dos tipos: PEV-9 y PEV-10
	<i>Enterovirus A de simio</i>	un tipo: enterovirus de simio (SEV) A1
<i>Rhinovirus</i>	<i>Rhinovirus A humano</i> *	74 serotipos
	<i>Rhinovirus B humano</i>	25 serotipos
	<i>Rhinovirus C humano</i> *	7 serotipos
<i>Hepatovirus</i> (también clasificado como <i>Heparnavirus</i>)	<i>Virus de la Hepatitis A</i> *	un serotipo: Virus de la Hepatitis A (HAV)
	Virus del tipo de la encefalomiелitis aviar	un tipo: virus de la encefalomiелitis aviar (AEV)
<i>Cardiovirus</i>	<i>Virus de la encefalomiocarditis</i> *	un serotipo: virus de la encefalomiocarditis (EMCV). Notas: Columbia SK: virus, el virus de Maus Elberfeld y el Mengovirus son cepas de EMCV.
	<i>Theilovirus</i>	cinco tipos: virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV), virus de la encefalomiелitis humana de Vilyuisk (VHEV), virus de tipo Theiler (TLV) de rataa, virus Saffold (SAFV) 1 y SAFV-2
<i>Aftovirus</i>	<i>Virus de la enfermedad de la fiebre aftosa</i> ^[2] *	siete serotipos: O, A, C, Territorios Sudafricanos (SAT) 1, SAT 2, SAT 3 y Asia 1
	<i>Virus de la rinitis equina A</i>	serotipo único: virus de la rinitis equina A (ERAV)
<i>Parechovirus</i>	<i>Parechovirus humano</i> *	seis tipos: <i>Parechovirus</i> humano (HPeV) 1, HPeV-2, HPeV-3, HPeV-4, HPeV-5, HPeV-6
	<i>Virus Ljungan</i>	Posiblemente, se han descrito tres tipos
<i>Erbovirus</i>	<i>Virus de la rinitis equina B</i> *	Tres tipos: virus de la rinitis equina B (ERBV) 1, ERBV-2, ERBV-3
<i>Kobuvirus</i>	<i>Aichivirus</i> *	serotipo único: Aichivirus (AiV)
	<i>Kobuvirus bovino</i>	Serotipo único: Kobuvirus bovino (BKV)
<i>Teschovirus</i>	<i>Teschovirus porcino</i> *	11 serotipos: <i>Teschovirus</i> porcino (PTV) 1 a PTV-11

Existen también picornavirus de plantas que se han clasificado en la superfamilia *Secoviridae* que contienen las familias *Comoviridae* (géneros *Comovirus*, *Fabavirus* y *Nepovirus*), *Sequiviridae* (géneros *Sequivirus* y *Waikavirus*) y diversos géneros sin asignar (*Cheravirus*, *Sadwavirus* y *Torradorvirus* (especies del tipo del virus del torrado del tomate)).

5

El virus puede ser un virus de las abejas, tal como el virus israelí de la parálisis aguda; virus Kashmir de las abejas; virus Kakugo; Virus *Varroa destructor*; Virus Sacbrood; Virus de las alas deformadas. Todos estos virus se han relacionado con la pérdida de colonias de abejas, de modo que existe la necesidad de pruebas diagnósticas para determinar la causa de la pérdida de colonias.

10

El virus puede ser un patógeno de animales, tal como el FMDV o el virus de la enfermedad vesicular porcina. El virus puede ser un patógeno de seres humanos, tal como el Enterovirus 71 (que produce brotes de diarrea); los virus Coxsackievirus B (que producen diabetes y miocarditis), o el poliovirus.

15

La producción de cápsides vacías para virus que (en su estado natural) actúan como patógenos de seres humanos o animales, es importante para la generación de vacunas y composiciones terapéuticas.

Vacuna

5 El término "vacuna" como se utiliza en el presente documento se refiere a la preparación que, cuando se administra a un sujeto, induce o estimula una respuesta inmunitaria protectora. Una vacuna puede hacer que un organismo se vuelva inmune a una enfermedad particular.

La vacuna puede utilizarse terapéuticamente, para tratar una infección existente; o profilácticamente, para bloquear o reducir la posibilidad de infección y/o prevenir o reducir la probabilidad de contraer la enfermedad.

10 Una vacuna comprende una o varias entidades de vacunación y opcionalmente uno o varios adyuvantes, excipientes, transportadores y diluyentes.

15 La vacuna puede también comprender, o ser capaz de expresar, otro agente activo, por ejemplo, uno que pueda estimular protección temprana antes de la respuesta inmunoadaptativa inducida por la entidad de vacunación. El agente puede ser un agente antivírico, tal como un interferón de tipo I. Como alternativa, o además, el agente puede ser un factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF).

20 La entidad de vacunación puede comprender, por ejemplo, la construcción según el primer aspecto de la invención, el vector según el segundo aspecto de la invención o una cápside vacía producida por la célula hospedadora según el tercer aspecto de la invención.

25 La vacunación de ADN tiene algunas ventajas sobre las vacunas basadas en proteínas. Por ejemplo, una vacuna de ADN produce la expresión endógena del antígeno *in vivo*, lo que permite que los péptidos antigénicos se presenten al sistema inmunitario por medio de las rutas del MHC de clase I y II, estimulando así no solo a linfocitos T CD4+, sino también a linfocitos T CD8+. Las vacunas de ADN son, por lo tanto, capaces de inducir una fuerte respuesta inmunitaria tanto a nivel humoral como celular. El uso de ADN plasmídico como una vacuna puede también activar el sistema inmunitario del hospedador, a través de los motivos de CpG no metilados en el esqueleto plasmídico bacteriano y del receptor 9 de tipo Toll (TLR9).

30 La vacuna puede carecer de los genes 2B y 2C que codifican proteínas no estructurales que pueden interferir con las respuestas inmunitarias celulares mediante la regulación negativa del MCH y la secreción de citocinas (Moffat et al., (2005) J Virol. 79. 4382-95 y Moffat et al., (2007) J Virol. 81. 1129-39).

35 Muchas vacunas para las FMD disponibles en el comercio son multivalentes para proporcionar protección contra los distintos serotipos de FMD. Por la misma razón, la vacuna de la presente invención puede comprender una pluralidad de entidades de vacunación, cada una de ellas dirigida a diferentes serotipos y/o a diferentes subtipos dentro de un serotipo determinado.

40 Tratamiento/prevenición de la enfermedad

La presente divulgación también proporciona un método para tratar y/o prevenir una enfermedad en un sujeto mediante la administración de una cantidad eficaz de dicha vacuna.

45 El término 'prevenir' pretende referirse a evitar, retrasar, impedir u obstaculizar la contracción de la enfermedad. La vacuna puede, por ejemplo, prevenir o reducir la probabilidad de que un virus infeccioso se introduzca en una célula.

50 El término 'tratar', como se utiliza en la presente invención, se refiere al cuidado para que un sujeto enfermo, se mejore, se cure o reduzca los síntomas de la enfermedad, o reduzca o detenga el avance de la enfermedad. También se refiere al tratamiento que hace que el sujeto infectado con el virus no sea infeccioso para otros sujetos.

El sujeto puede ser cualquier animal o vegetal que sea susceptible de contraer la enfermedad. El sujeto puede ser un ser humano, un insecto (tal como una abeja), un vegetal, un mamífero u otro animal.

55 Para la FMD el sujeto puede ser un animal de pezuña hendida. Los animales susceptibles de contraer la FMD incluyen ganado bovino, ovejas, cerdos y cabras entre otros animales de granja, así como camélidos (camellos, llamas, alpacas, guanacos y vicuñas). Algunos animales salvajes tales como los erizos, los coipos, y cualquier animal salvaje de pezuña hendida, tal como ciervos y animales de zoológico, incluidos los elefantes, también pueden contraer la FMD.

60 Administración

65 Como métodos de suministro de genes no víricos se incluyen el uso de estrategias físicas (suministro de genes sin transportador) y químicas (suministro de genes basado en vectores sintéticos). Las estrategias físicas, incluida la inyección por aguja, electroporación, pistola génica, ultrasonidos, y administración hidrodinámica, emplean una fuerza física que penetra en la membrana celular y facilita la transferencia intracelular de genes. Las estrategias

químicas utilizan compuestos que se originan de forma sintética o natural como transportadores para suministrar la secuencia de nucleótidos en las células.

5 El método de suministro más adecuado dependerá del sistema de suministro utilizado para una célula diana. Por ejemplo, Para la administración de plásmidos, la preparación de plásmidos puede administrarse por vía intramuscular, intradérmica o una combinación de las anteriores.

10 Los vectores víricos pueden administrarse a un sujeto por métodos conocidos en la técnica, tal como la inyección directa.

Control retroviral de una proteína picornavírica

15 La presente divulgación también se refiere al uso de un elemento de control retroviral para controlar la expresión de una proteína picornavírica y a una construcción que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína picornavírica bajo el control de un elemento de control retroviral.

20 El elemento de control retroviral puede ser un sitio de desplazamiento de la fase de lectura retroviral, tal como un sitio de desplazamiento de la fase de lectura que puede proceder del sitio de desplazamiento de la fase de lectura del VIH-1 que controla la expresión de Gag y Gag-pol en este virus.

La proteína de picornavirus puede ser una proteína no estructural, tal como una proteasa. La proteína de picornavirus puede ser capaz de escindir una proteína precursora de cápside. La proteína de picornavirus puede ser una proteasa 3C de un picornavirus o su precursor 3CD.

25 La invención se describirá ahora adicionalmente a modo de Ejemplos, que están destinados a ayudar a un experto en la técnica a realizar la invención y no pretenden de ninguna manera limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

30 Ejemplo 1 - Análisis mutacional de la proteasa 3C en un vector en el que su expresión está bajo el control del promotor p10

35 El vector de transferencia de baculovirus pOPINE5949 codifica la proteína precursora de cápside de FMDV P1 seguido de la proteasa 3C de FMDV conectada por una región espaciadora corta (2A-3B3) bajo el control del fuerte promotor p10 de baculovirus (Figura 1). La mayor parte del resto del genoma del FMDV falta. Cuando se utiliza para generar un baculovirus recombinante, el resultado teórico es la expresión de una proteína de fusión P1-2A-3B3-3C que se auto escindiría para producir las proteínas de cápsides maduras VP1-4 (codificadas por P1) y ensamblarse en cápsides de virus. El resultado real de la infección con dicho baculovirus recombinante es que se produce muy poco producto.

40 Esta pequeña cantidad de producto es el resultado de la toxicidad de 3C. Esto se ilustra por el hecho de que la inclusión, dentro de pOPINE5949, de una sola mutación puntual de la cisteína (Cys 163) del sitio activo de 3C permite la expresión de cantidades abundantes de la proteína de fusión P1-2A-3B3-3C (Figura 2). Esto demuestra formalmente que la actividad de 3C es un rasgo determinante de la síntesis del FMDV recombinante.

Métodos

La mutación de Cys 163 se introdujo por mutagénesis dirigida estándar y después el casete mutante se reexpresó.

50 Análisis por transferencia de Western

55 Se separaron muestras de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS Tris.HCl preenvasados al 10% (BioRad) y utilizando un secante semiseco se transfirieron a membranas Immobilon-P (Millipore). Se bloquearon los filtros durante una hora a temperatura ambiente utilizando TBS que contenía Tween-20 (TBS-T) al 0,1 % v/v leche en polvo al 5 % p/v. Se utilizó un anticuerpo primario de cobaya contra el virus FMDV de tipo A a una dilución de 1:1000 en PBS-T, leche en polvo al 5 % p/v durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de varios lavados con TBS-T las membranas se incubaron durante 1 hora con anticuerpo contra cobaya conjugado con HRP y los anticuerpos unidos se detectaron por quimioluminiscencia BM (Roche).

60 Ejemplo 2 - Producción de una construcción en la que se reduce la actividad y la expresión de la proteasa 3C

Para moderar la actividad de la proteasa 3C entre estos dos extremos, se combinaron dos estrategias, de la siguiente manera:

65 1) introducción de un elemento de desplazamiento de la fase de lectura en la región del enlazador 3B entre las secuencias que codifican P1 y 3C que provoca una reducción en la cantidad de 3C sintetizada; y

2) mutación del resto 3C, Cys142, reduciendo de esta manera la actividad de 3C

5 Un elemento de desplazamiento de la fase de lectura es una sección de secuencia que provoca que el ribosoma traductor salte una base en un porcentaje de casos cuando lee un ARNm. Un elemento de desplazamiento de la fase de lectura bien descrito es el descrito para el retrovirus VIH-1 que provoca un desplazamiento de la fase de lectura de -1 en aproximadamente el 5 % de los ARNm traducidos. Los presentes inventores utilizaron la secuencia definida por Dinman et al., (PNAS 16 de abril, 2002 vol. 99 n°. 8 5331-5336 (Figura 3).

10 El vector pOPINE5949-FS se construyó por lo tanto con la secuencia de desplazamiento de la fase de lectura insertada en la región del enlazador 3B3 de tal manera que la fase de lectura termine en este lugar. La inserción de la secuencia de desplazamiento de la fase de lectura interrumpe la continuidad del ARNm de P1-2A-3B3-3C de tal manera que el producto traducido se trunca en la región 3B3 y no se produce 3C (a pesar de que la secuencia cadena abajo que la codifica está presente en el mensaje). Sin embargo, un desplazamiento de la fase de lectura de menos 1 por el ribosoma en esta región produce la expresión de la proteína de fusión P1-2A-3B3-3C por un subconjunto de ARNm implicados en el ribosoma (Figura 4). Si la frecuencia del evento de desplazamiento de la fase de lectura en las células de insecto es la misma que la que se ha medido en las células de mamífero, entonces, los productos de la traducción serán del 95 % de P1-2A y del 5 % de P1-2A-3B3-3C. Existe por lo tanto un nivel proporcionalmente bajo de síntesis de proteasa 3C.

20 Un baculovirus recombinante construido utilizando la secuencia pOPINE5949 mostró un patrón de escisión en consonancia con la generación de niveles bajos de proteasa 3C (datos no mostrados). Sin embargo, el nivel global de síntesis aún indicaba alguna citotoxicidad y la actividad de 3C se redujo aún más por la mutagénesis dirigida de la secuencia 3C en la posición Cys 142 que tiene una función en la actividad enzimática (Sweeney *et al* (2007 - como se ha mencionado anteriormente)) (Figura 5).

25 Ejemplo 3 - Producción de producto VP1 escindido y cápsides vacías de FMDV

30 La combinación de un desplazamiento de la fase de lectura y la mutación de 142T en un baculovirus recombinante produjo el nivel deseado de P1 y 3C y dio lugar a cantidades sustanciales del producto VP1 escindido, el cual se ensambló con otro producto de escisión para formar la cápside vacía de FMDV.

REIVINDICACIONES

1. Una construcción que, cuando se expresa en una célula hospedadora, es capaz de producir cápsides vacías de picornavirus, comprendiendo la construcción:
- 5 (i) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína precursora de cápside P1;
- (i) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteasa 3C, capaz de escindir la proteína precursora de cápside de picornavirus, donde la proteasa incluye una mutación en Cys142 que reduce su actividad de escisión de la proteína precursora de cápside; y
- 10 (iii) un elemento de control que controla la expresión de la proteasa
- de modo que, cuando la construcción está presente en la célula hospedadora, el elemento de control provoca que la proteasa se exprese a un nivel suficiente para escindir la proteína precursora de cápside, pero no suficiente para inducir una toxicidad significativa en la célula hospedadora, donde el elemento de control es un sitio de desplazamiento de la fase de lectura del retrovirus.
- 15 2. Una construcción según la reivindicación 1, donde el elemento de control es el sitio de desplazamiento de la fase de lectura de VIH-1.
- 20 3. Una construcción según la reivindicación 2, donde el sitio de desplazamiento de la fase de lectura se sitúa entre la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína precursora de cápside y la secuencia de nucleótidos que codifica una proteasa, de tal manera que cuando se traduce la construcción: si el ribosoma no experimenta un desplazamiento de la fase de lectura produce un producto truncado que comprende la proteína precursora de cápside pero no la proteasa; si el ribosoma sí experimenta un desplazamiento de la fase de lectura, se traducen tanto la proteína precursora de cápside como la proteasa.
- 25 4. Una construcción según la reivindicación 2 o 3, donde el elemento de control provoca un desplazamiento de la fase de lectura en aproximadamente el 5% de los ARNm traducidos.
- 30 5. Una construcción de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, donde la proteasa con la mutación tiene una actividad de escisión de la proteína precursora de cápside aproximadamente 3 veces inferior que la de proteasa 3C de tipo silvestre.
- 35 6. Una construcción según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que, cuando se expresa en una célula hospedadora, es capaz de producir cápsides vacías del virus de la enfermedad de la fiebre aftosa (FMDV).
7. Un vector que comprende una construcción según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 40 8. Un vector según la reivindicación 7, que es un vector de transferencia de baculovirus; un vector de ADN, un plásmido o un vector vírico.
9. Una célula hospedadora que comprende una construcción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 45 10. Una célula hospedadora según la reivindicación 9, que es una célula de insecto o una célula de mamífero.
11. Un método para producir cápsides vacías de virus que comprende las siguientes etapas:
- (i) la expresión de una construcción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en una célula hospedadora; y
- 50 (ii) la recogida de las cápsides vacías de virus producidas por la célula hospedadora.
12. Un método para la producción de una vacuna, que comprende la etapa de producir cápsides vacías de virus mediante un método según la reivindicación 11 e incorporar las cápsides vacías de virus en una vacuna.

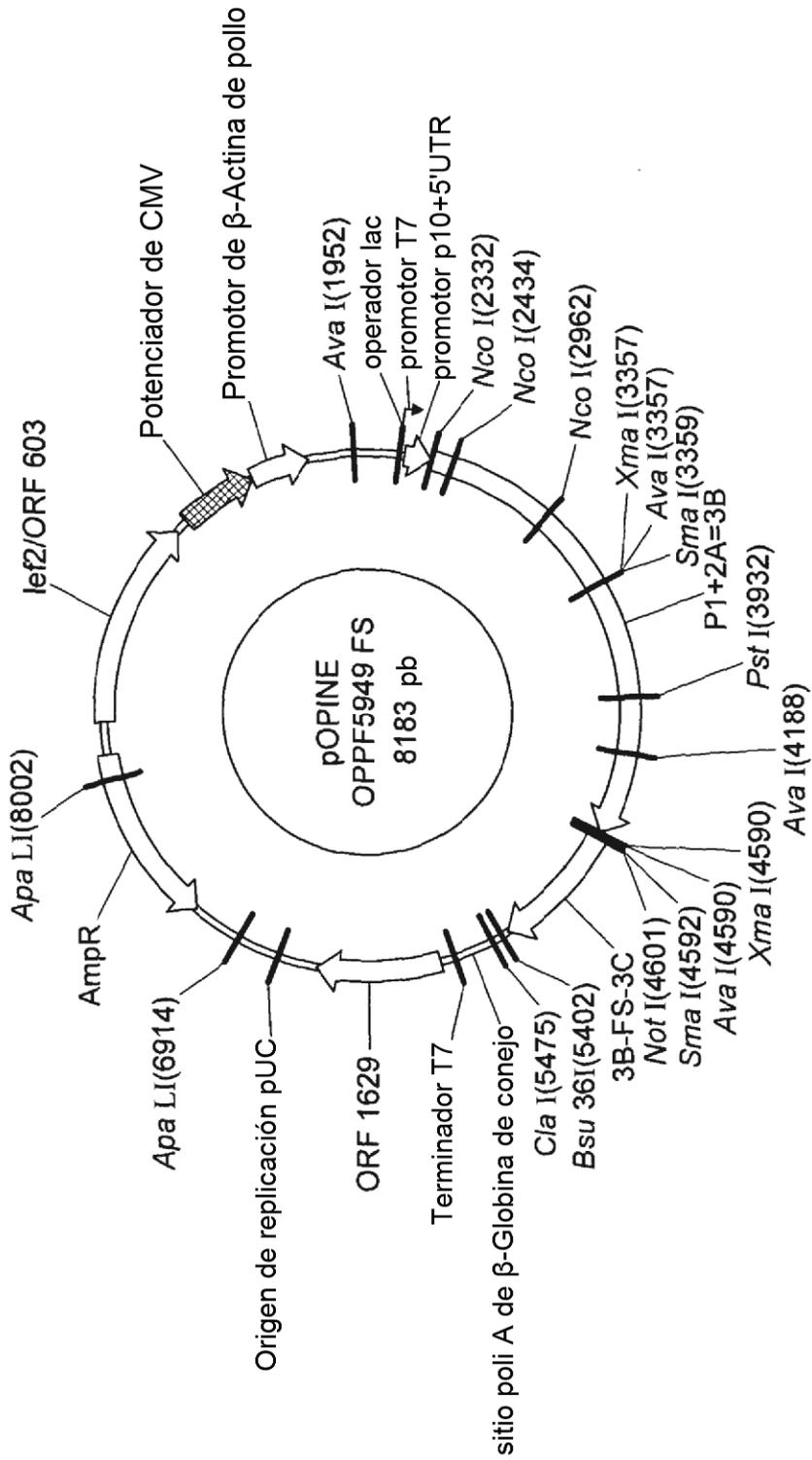


FIG. 1

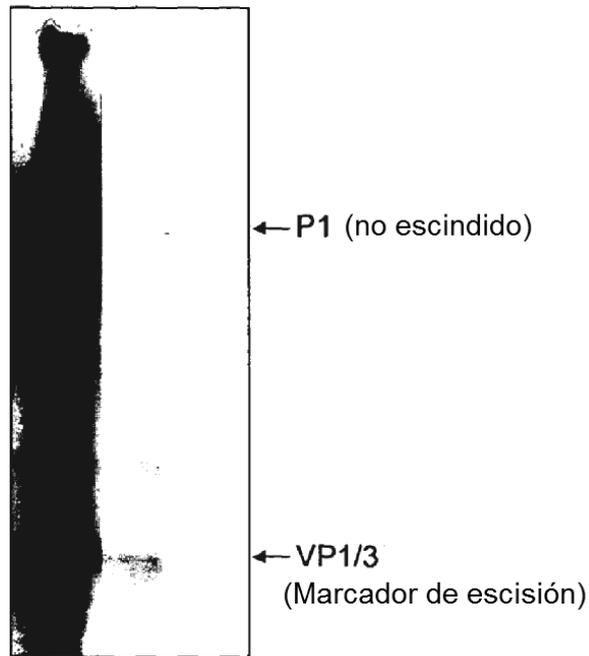


FIG. 2

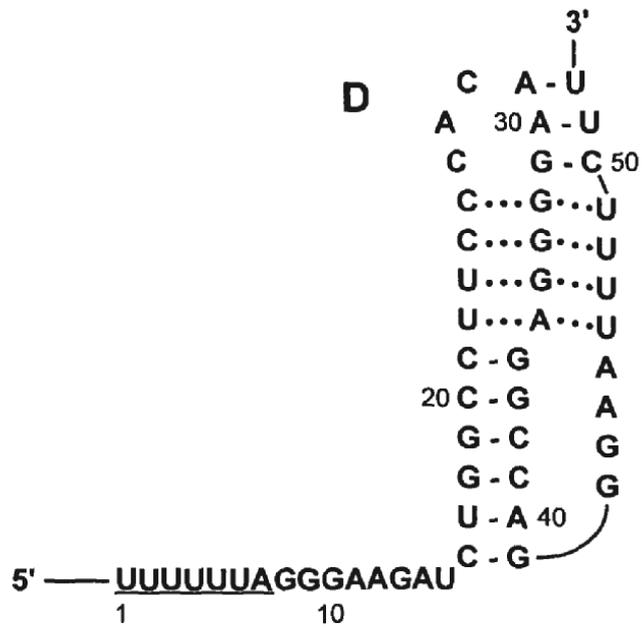


FIG. 3

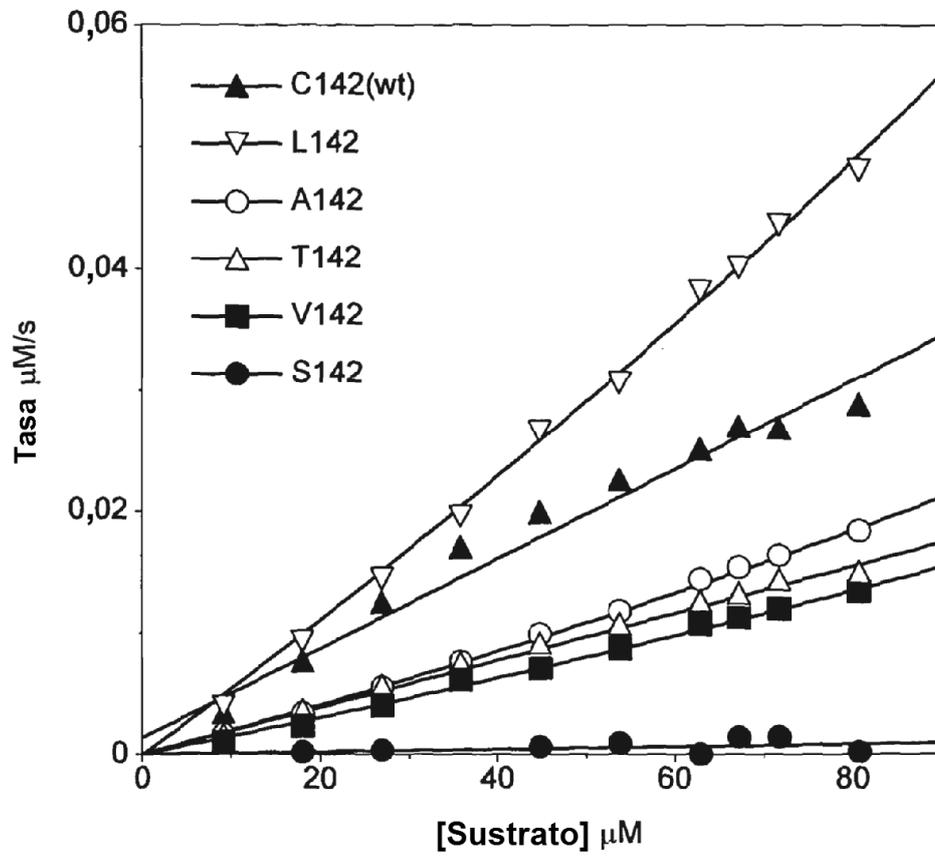


FIG. 5

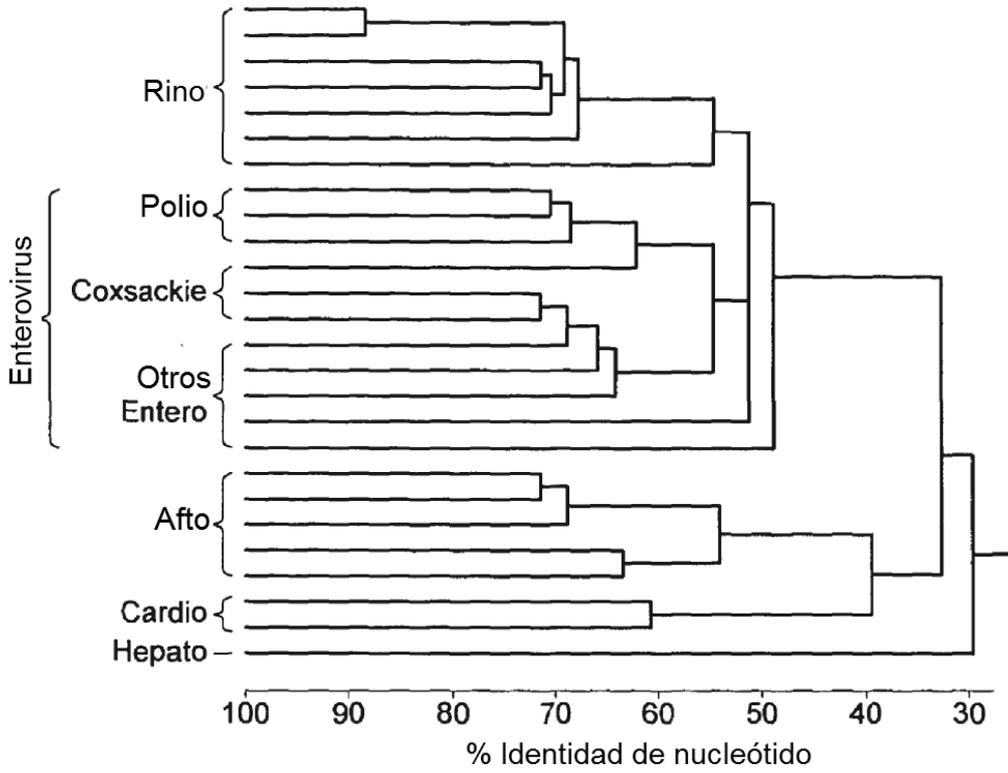


FIG. 6

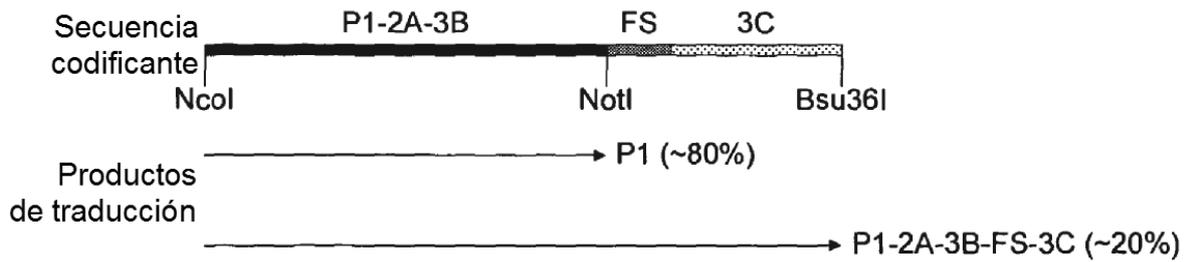


FIG. 7

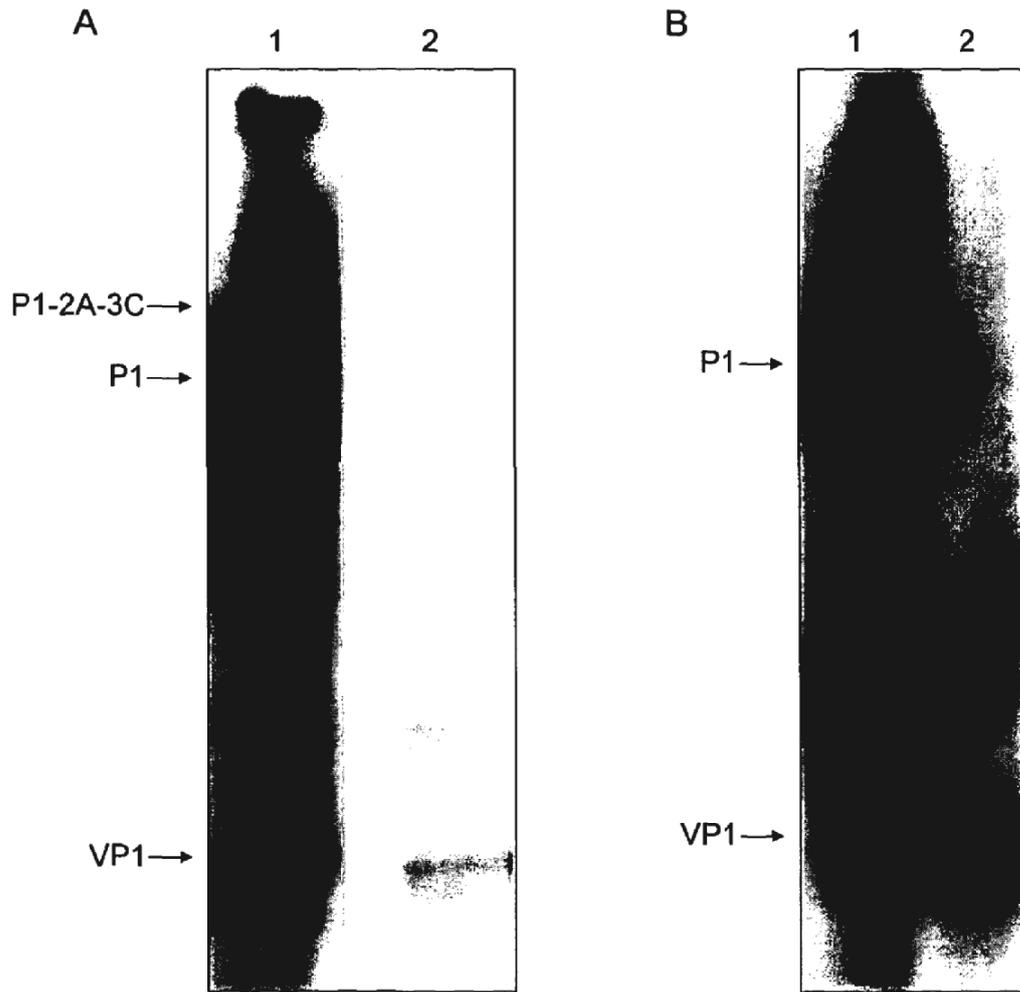


FIG. 8

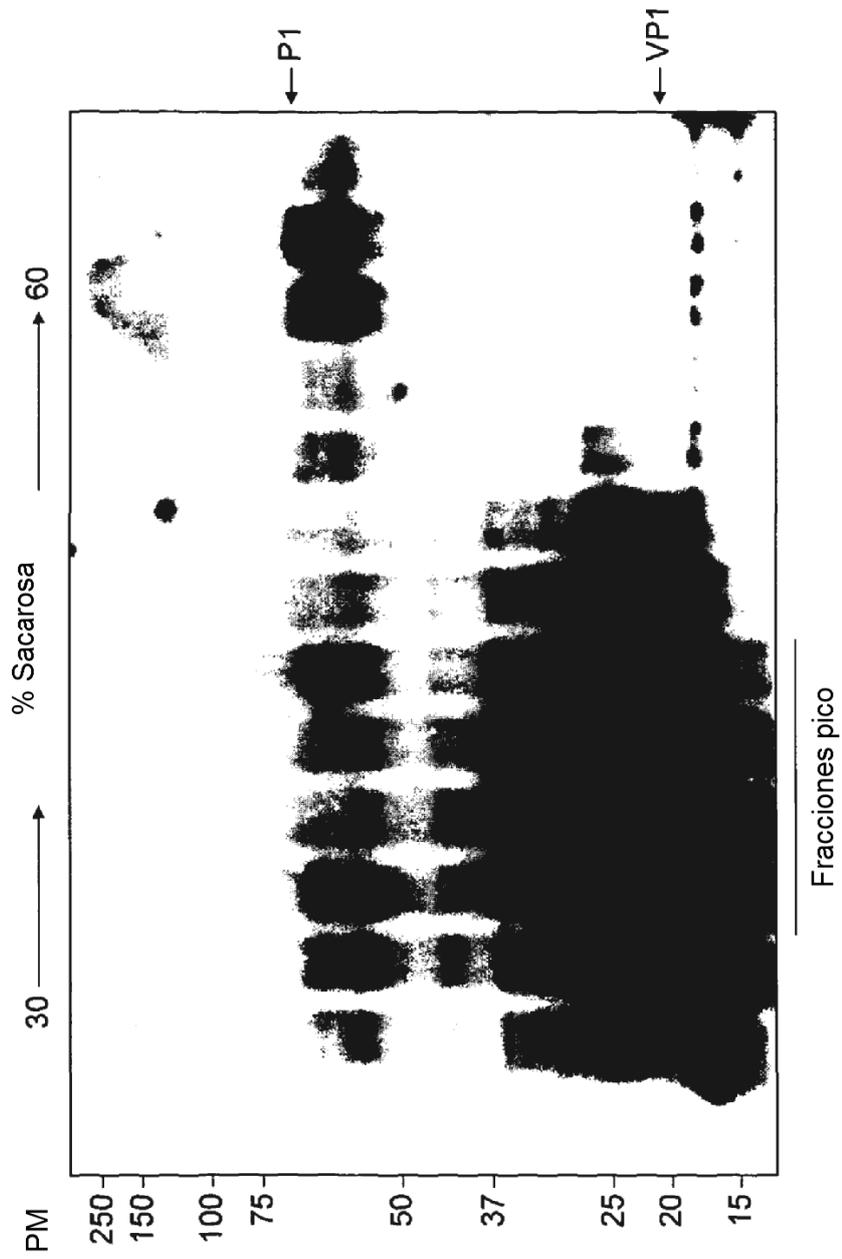


FIG. 9

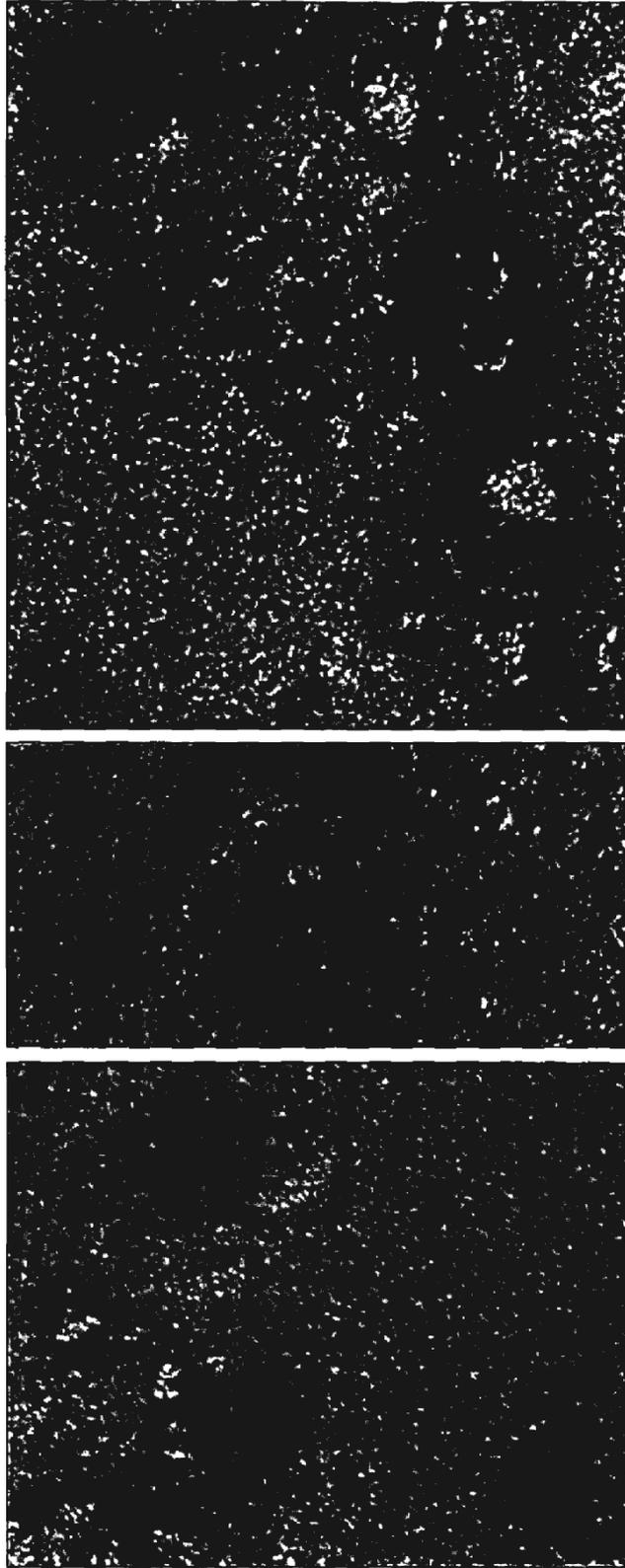


FIG. 10

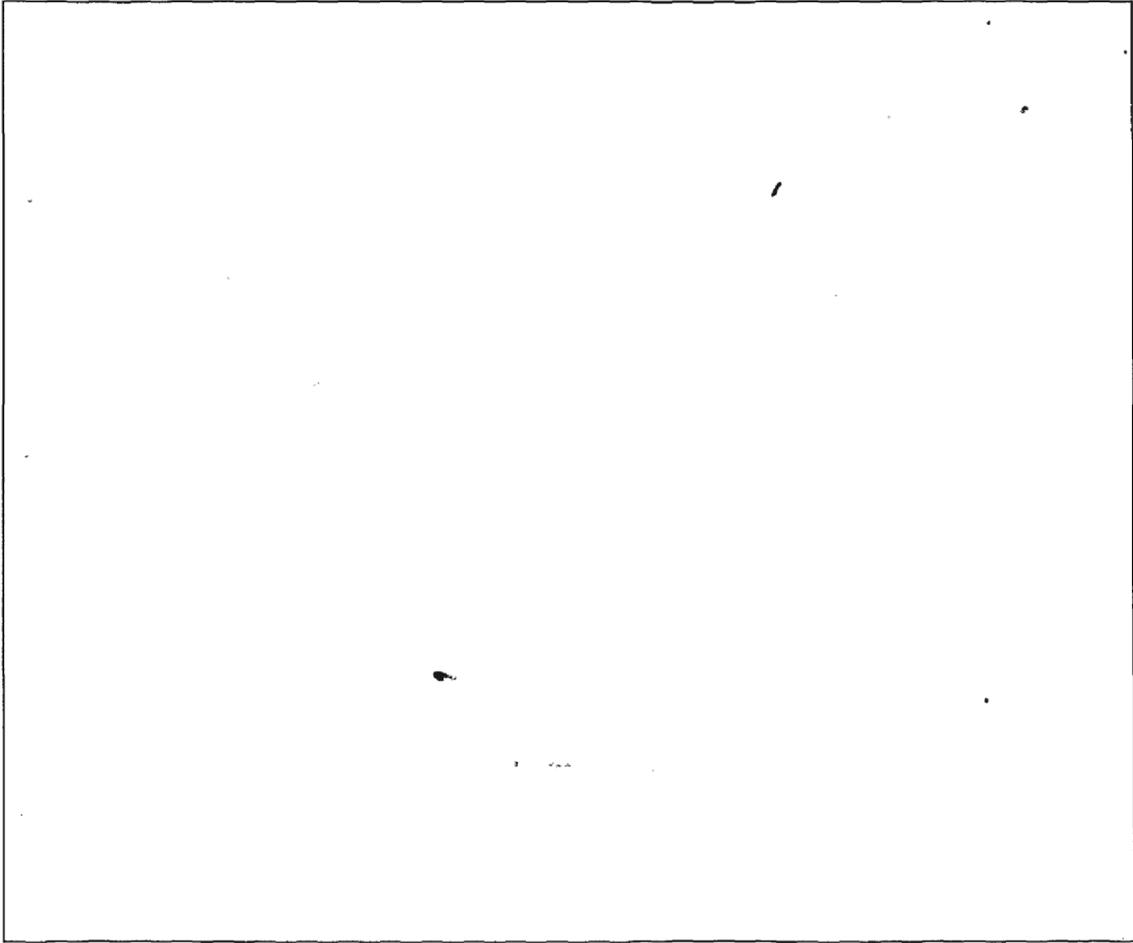


FIG. 11

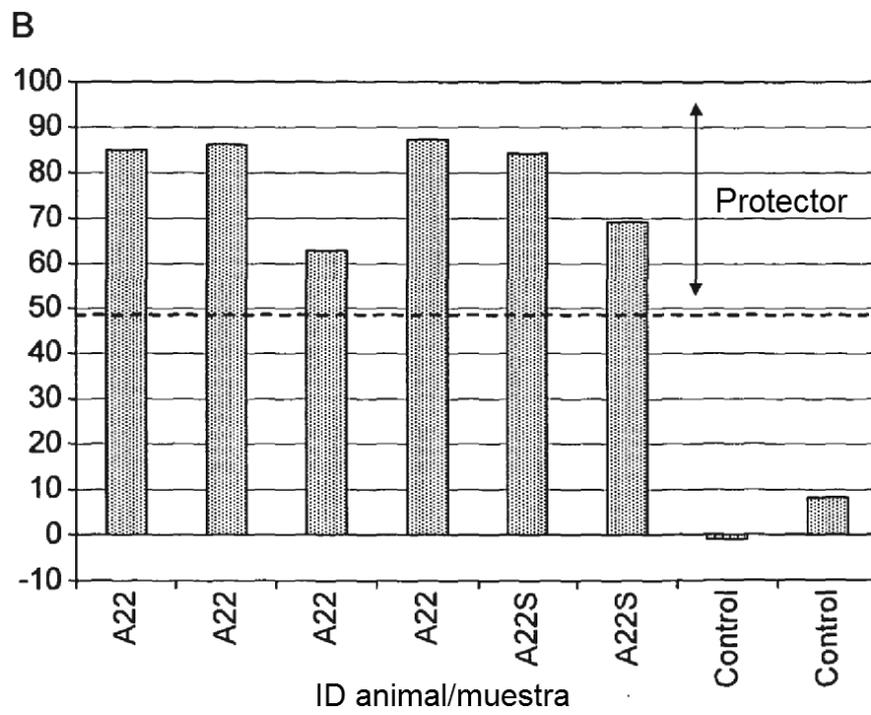
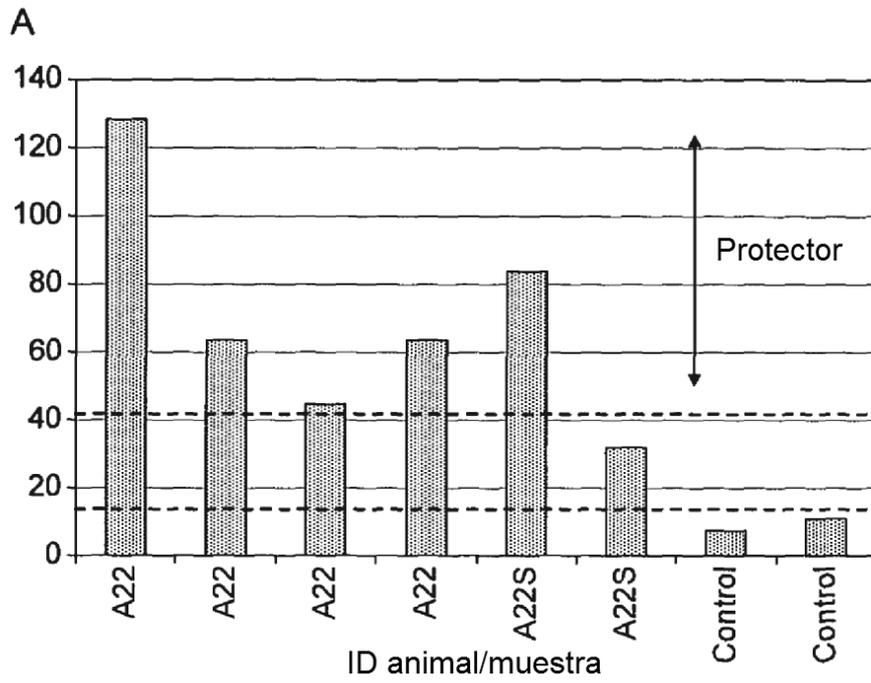


FIG. 12