



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 122019005271-9 B1



(22) Data do Depósito: 12/12/2003

(45) Data de Concessão: 13/10/2020

(54) Título: MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE PARTÍCULAS DE REPLICON DE ALFAVÍRUS (ARPS)

(51) Int.Cl.: C12N 7/02; C12N 15/86; A61K 39/193.

(30) Prioridade Unionista: 13/12/2002 US 60/433,058.

(73) Titular(es): ALPHAVAX, INC..

(72) Inventor(es): JONATHAN F. SMITH; KURT KAMRUD; SERGEY DRYGA; HAROLD ALTERSON; JON RAYNER; KIM BUTLER ALTERSON; MAUREEN F. MAUGHAN.

(86) Pedido PCT: PCT US2003039725 de 12/12/2003

(87) Publicação PCT: WO 2004/055167 de 01/07/2004

(85) Data do Início da Fase Nacional: 18/03/2019

(62) Pedido Original do Dividido: PI0317276-7 - 12/12/2003

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a métodos para a produção de partículas de replicon do alfavírus em altos rendimentos; os RNAs do replicon são submetidos à eletroporação em células permissivas, em que as células estão em uma densidade relativamente alta, junto com pelo menos um ácido nucléico auxiliador que fornece as funções necessárias para o empacotamento. Após um período de crescimento no meio apropriado, as partículas de replicon do alfavírus são coletadas das superfícies das células em que foram produzidas utilizando uma lavagem com sal em que a concentração de sais é de aproximadamente 0,2 até aproximadamente 5 M de cloreto de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de potássio, acetato de amônio, bicarbonato de amônio, entre outros. Após a diluição, se necessário, as partículas podem ser purificadas através de uma técnica cromatográfica adequada.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MÉTODO PARA A PREPARAÇÃO DE PARTÍCULAS DE REPLICON DE ALFAVÍRUS (ARPs)".**

[0001] Dividido do PI0317276-7, depositado em 12.12.2003.

Fundamento da Invenção

[0002] A presente invenção refere-se à tecnologia do DNA recombinante e em particular à introdução de ácido(s) nucléico(s) estranho(s) em uma célula eucariótica e mais particularmente a métodos para a produção de partículas virais ou partículas similares a vírus infecciosas em altos rendimentos, especialmente partículas úteis em aplicações para terapias imunológicas e/ou terapia gênica. Em particular, a presente invenção descreve um processo possível comercialmente compatível com GMP e de alto rendimento para a produção de preparações de partículas de replicons de alfavírus altamente purificadas (ARP) adequadas para uso na medicina humana e veterinária.

[0003] O gênero dos Alfavírus inclui uma variedade de vírus, dos quais todos são membros da família Togaviridae. Os alfavírus incluem o Vírus da Encefalite Equina do Leste (EEE), o Vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEE), o Vírus Everglades, o Vírus Mucambo, o Vírus Pixuna, o Vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEE), o Vírus Sindbis, o Vírus Semliki Forest, o Vírus Middleburg, o Vírus Chikungunya, o Vírus O'nyong-nyong, o Vírus Ross River, o Vírus Barmah Forest, o Vírus Getah, o Vírus Sagiyama, o Vírus Bebaru, o Vírus Mayaro, o Vírus Una, o Vírus Aura, o Vírus Whataroa, o Vírus Babanki, o Vírus Kyzylgach, o vírus Highlands J, o Vírus Fort Morgan, o Vírus Ndumu e o Vírus Buggy Creek. O genoma viral é um RNA com sentido de mensageiro de filamento simples, modificado na extremidade 5' com um cap metilado e na extremidade 3' com um trato poli (A) de comprimento variável. As subunidades estruturais que contêm uma única proteína viral, o capsídeo, se associam com o genoma de RNA

em um nucleocapsídeo icosaédrico. No vírion, o capsídeo é circundado por um envelope lipídico coberto com um arranjo regular de espículas protéicas transmembranas, das quais cada uma consiste em um complexo heterodimérico de duas glicoproteínas, E1 e E2. Ver Pedersen e outros, *J. Virol* 14:40 (1974). Os vírus Sindbis e Semliki Forest são considerados o protótipo dos alfavírus e foram estudados extensivamente. Ver Schlesinger, *The Togaviridae and Flaviviridae*, Plenum Publishing Corp., Nova York (1986). O vírus VEE foi estudado extensivamente, ver, por exemplo, a Patente U.S. Nº 5.185.440.

[0004] Os estudos destes vírus levaram ao desenvolvimento de técnicas para a vacinação contra doenças causadas pelos alfavírus e contra outras doenças através do uso de vetores de alfavírus para a introdução de genes estranhos. Ver a Patente U.S. Nº 5.185.440 a Davis e outros e a Publicação PCT WO 92/10578. O uso de vetores de alfavírus para direcionar a expressão de genes estranhos em eucariotos se tornou um tópico de crescente interesse. É bem conhecido que vacinas com vírus atenuados vivos estão entre os meios mais bem sucedidos de controle de doença viral. Entretanto, para alguns agentes patogênicos virais, a imunização com uma cepa de vírus vivo pode ser impraticável ou insegura. Uma estratégia alternativa é a inserção de seqüências que codificam antígenos imunizantes de tais agentes em uma cepa replicante viva de um outro vírus. Um sistema deste tipo utilizando um vetor de VEE vivo é descrito nas Patentes U.S. Nºs 5.505.947 e 5.643.576 a Johnston e outros. Um outro sistema deste tipo é descrito por Hahn e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2679-2683 (1992), em que constructos do vírus Sindbis expressam uma forma truncada da proteína hemaglutinina do influenza. Um outro sistema é o sistema de replicon de alfavírus, que é descrito na Patente U.S. Nº 6.190.666 a Garoff e outros, nas Patentes U.S. Nºs 5.792.462 e 6.156.558 a Johnston e outros, nas Patentes U.S. Nºs 5.814.482,

5.843.723, 5.789.245, 6.015.694, 6.105.686 e 6.376.236 a Dubensky e outros; no Pedido de Patente U.S. Publicado Nº 2002-0015945 A1 (Polio e outros), no Pedido de Patente U.S. Publicado Nº 2001-0016199 (Johnston e outros), Frolov e outros (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:11371-11377 e Pushko e outros (1997) *Virology* 239:389-401.

[0005] Conseqüentemente, permanece uma necessidade na técnica de métodos, que permitam a produção de partículas de alfavírus altamente imunogênicas infecciosas e derivados das mesmas em alta pureza e em alto rendimento, especialmente para uso em preparações de vacinas de alta pureza.

Sumário da Invenção

[0006] A presente invenção fornece um processo comercialmente possível compatível com GMP de alto rendimento para a produção de preparações de partículas de replicon de alfavírus altamente purificadas (ARP) ou virais adequadas para uso na medicina humana e veterinária. A presente invenção também pode ser aplicada na produção de vacinas de alfavírus atenuadas vivas e de composições imunogênicas contendo os mesmos, cujo alfavírus atenuado pode ou não carregar genes heterólogos para expressão na vacina, como descrito na Patente U.S. Nº 5.643.576. O método da presente invenção compreende as etapas de (a) introdução de um ácido nucléico de replicon de alfavírus (ou um ácido nucléico de alfavírus) em uma célula hospedeira, em que o dito ácido nucléico de replicon contém pelo menos um sinal de empacotamento de alfavírus e pelo menos uma seqüência codificadora de um ou mais genes de interesse que podem ser expressos no dito ácido nucléico de replicon de alfavírus, em que a célula hospedeira é capaz de expressar proteínas estruturais de alfavírus necessárias para a produção de ARPs, para produzir uma célula hospedeira modificada; (b) cultura da dita célula hospedeira modificada em meio sob condições que permitem a expressão das proteínas estrutu-

rais e a replicação do ácido nucléico do replicon de alfavírus e então o empacotamento do ácido nucléico do replicon de alfavírus para formar ARPs; (c) separação opcional das células hospedeiras modificadas do meio e (d) após a etapa (b) ou (c) contato das células hospedeiras modificadas com uma solução aquosa que possui uma força iônica de pelo menos aproximadamente 0,20 M ou de aproximadamente 0,2 M até aproximadamente 5 M, (citada aqui como "Meio de Liberação") para liberar as ARPs na solução aquosa para produzir uma solução que contém ARPs. A força iônica do Meio de Liberação pode ser atingida utilizando sais que não inativam os vírions ou as ARPs e os sais adequados incluem, mas não estão limitados ao cloreto de sódio, ao cloreto de magnésio, ao cloreto de amônio, ao acetato de amônio, ao cloreto de potássio, ao cloreto de cálcio e ao bicarbonato de amônio. Vantajosamente, o Meio de Liberação (lavagem com sais) compreende um tampão com um pH de aproximadamente 6 até aproximadamente 9, de forma desejável de aproximadamente 6,5 até aproximadamente 8,5. Quando as células não são separadas do meio, a força iônica do meio pode ser aumentada através da adição de um sal sólido ou de uma solução concentrada de sal para fornecer uma maior força iônica para a liberação das ARPs (ou vírions) das células. A lavagem com sais das células produtoras com o Meio de Liberação parece aumentar a recuperação das ARPs, especialmente quando há alterações particulares de superfície na superfície das ARPs; no caso do VEE, os resíduos de aminoácidos em E2-209 e/ou E2-120 parecem fornecer bons sítios para a introdução de uma carga positiva. As substituições de aminoácidos que resultam nas alterações de cargas em certos mutantes de vírus atenuados aumentam a recuperação das ARPs pela lavagem com sais. O fosfato de sódio a 16 mM, o NaCl a 0,5 M é um exemplo de Meio de Liberação utilizado na lavagem com sais.

[0007] As ARPs ou partículas virais são produzidas em uma célula

que permita o empacotamento do vírus ou do ácido nucléico do replicon em partículas infecciosas, isto é, em uma célula permissiva para o alfavírus. O vetor de RNA do replicon do alfavírus (ou o ácido nucléico do replicon) pode ser derivado do VEE, do vírus Sindbis, particularmente TR339, do Arbovírus Sul Africano Nº 86, do vírus Semliki Forest, entre outros. Quando o ácido nucléico de um replicon é utilizado, as funções de empacotamento estão presentes na célula na qual as partículas são produzidas, partindo do(s) ácido(s) nucléico(s) introduzido(s) na célula em trans ou dos já presentes na célula. Para alguns vetores de replicon de alfavírus com certas seqüências codificadoras heterólogas, os presentes inventores observaram que o aumento na proporção do ácido nucléico auxiliador da glicoproteína do alfavírus aumenta o empacotamento e/ou o rendimento das ARPs.

[0008] Vantajosamente, a célula em que as ARPs são produzidas é uma célula de mamífero cultivada; mas células Vero, células renais de hamster bebê (BHK), células de fibroblastos embrionários de frango (CEF), DF-1, 293, 293T, células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) e células de insetos cultivadas são especialmente úteis. As células de insetos cultivadas disponíveis adequadas incluem, sem limitação, células SF21, de *Spodoptera frugiperda*; C6/36, de *Aedes albopictus*; TRA-171, de *Toxorhynchites amboinensis*; RML-12, de *Aedes aegypti*; AP-61, de *Aedes pseudoscutellaris*; e MOS-55, de *Anopheles gambiae*.

[0009] Vantajosamente, as células nas quais as ARPs devem ser produzidas são sincronizadas na fase G2/M do ciclo celular antes da eletroporação com o vetor de replicon de alfavírus e o(s) ácido(s) nucléico(s) auxiliador(es). Sem desejar estar ligado a qualquer teoria particular, acredita-se que a maior eficiência de eletroporação e de transferência do ácido nucléico ao núcleo (nas modalidades da invenção que envolvem atividade nuclear) da célula que foi submetida à eletroporação é atingida em tais células na fase G2/M.

[0010] O ácido nucléico do replicon do alfavírus pode compreender uma seqüência de nucleotídeos de interesse para ser expressa na célula hospedeira. A seqüência de nucleotídeos pode codificar um polipeptídeo imunogênico, uma citocina ou uma proteína terapêutica, entre outros ou a seqüência de nucleotídeos pode ser transcrita na célula hospedeira para produzir um RNA funcional, tal como uma ribozima, uma molécula interferente ou uma anti-sentido. Se um ácido nucléico de alfavírus for utilizado, este pode ser de um vírus do tipo selvagem, de um vírus recombinante que compreende uma seqüência de nucleotídeos de interesse como descrito aqui ou pode ser um vírus atenuado útil para a produção de uma resposta imunogênica no hospedeiro.

[0011] Quando o ácido nucléico do replicon viral e/ou o(s) ácido(s) nucléico(s) auxiliador(es) for(em) introduzido(s) através da eletroporação, é especialmente eficiente eletroporar as células em que as células estejam presentes em uma concentração de aproximadamente 10^7 até aproximadamente 10^9 células por mL, de forma desejável de aproximadamente 5×10^7 até aproximadamente $1,5 \times 10^8$ por mL, de meio para eletroporação, na presença de replicon e de ácido(s) nucléico(s) auxiliador(es) suficiente(s) para permitir o empacotamento eficiente. A(s) molécula(s) de RNA auxiliadora(s) não precisa(m) ter cap.

[0012] Após o ácido nucléico ser introduzido nas células nas quais as ARPs serão produzidas, as células são colocadas em recipientes de cultura contendo meio de crescimento. Para as células com maior crescimento na forma de células aderidas, o recipiente compreende meio de crescimento suficiente para permitir o crescimento, a replicação do RNA do replicon, a expressão de proteínas de empacotamento e a produção de partículas de replicon viral e uma área de superfície suficiente para estas células se aderirem e crescerem. A superfície pode ser as paredes de um recipiente, de um frasco ou de uma placa ou fibras côncavas, contas ou outros microveículos de material apro-

priado para o crescimento celular aderido podem ser colocados dentro do recipiente. As células Vero ou outras células cultivadas sobre microveículos (contas ou discos) podem sofrer eletroporação de forma bem sucedida sobre os veículos e cultivadas para produzirem as ARPs em níveis comparáveis aos atingidos com as células não-aderidas. As câmaras de crescimento em fibras côncavas ou "cubos de células" também são úteis. Após as células terem crescido e produzido partículas, tipicamente de aproximadamente 12 até aproximadamente 48 horas, as partículas são coletadas. As células podem ser separadas do meio de cultura, preferencialmente pré-lavadas para remover restos celulares e materiais extrínsecos e então lavadas com um volume menor de Meio de Liberação, com o resultado de que as ARPs estão livres das células e/ou dos restos celulares e podem ser então recuperadas em uma solução concentrada purificada. As partículas podem ser adicionalmente purificadas utilizando qualquer uma de um número de técnicas bem conhecidas na área, incluindo, mas não limitadas à cromatografia por imunoafinidade, à cromatografia por afinidade pela heparina ou à cromatografia de troca iônica e similares.

Breve Descrição dos Desenhos

[0013] A Figura 1 mostra a produção das ARPs utilizando RNAs auxiliares com cap (barra à esquerda em cada par) e RNAs auxiliares sem cap (barra à direita em cada par) em tipos diferentes de células cultivadas. As células foram submetidas à eletroporação com RNA do replicon cap e moléculas de RNA auxiliares com cap ou sem cap. As ARPs foram coletadas dos sobrenadantes de cultura 24 h após a eletroporação e tituladas em células Vero frescas.

[0014] A Figura 2 mostra o efeito do meio de crescimento pós-eletroporação sobre o rendimento das ARPs. Os resultados são fornecidos na forma do título no meio de cultura, do título na lavagem com NaCl a 1 M das células em péletes e do título total (meio mais lava-

gem).

[0015] A Figura 3 mostra os efeitos do pH do meio de crescimento sobre o rendimento das ARPs. As células Vero foram submetidas à eletroporação utilizando um eletrodo de placa de Petri e inoculadas em frascos com meios de crescimento completos ajustados nos valores de pH especificados.

[0016] A Figura 4 mostra o efeito de diferentes soluções de Lavagem de Células utilizadas logo antes da eluição das ARPs com o Meio de Liberação; os detalhes são fornecidos no Exemplo 7 aqui abaixo.

[0017] A Figura 5 mostra o efeito da utilização de composições diferentes de sais no Meio de Liberação sobre o rendimento das ARPs. As concentrações e os valores de pH de vários Meios de Liberação são como mostrados.

[0018] A Figura 6 mostra o rendimento das ARPs utilizando uma faixa de concentrações de NaCl no Meio de Liberação.

Descrição Detalhada da Invenção

[0019] A discussão e as definições a seguir são fornecidas para aumentar o esclarecimento da presente descrição para um versado na técnica relevante.

[0020] No contexto do presente pedido de patente, nm significa nanômetro, mL significa mililitro, VEE significa o Vírus da Encefalite Equina Venezuelana, EMC significa o Vírus da Encefalomiocardite, BHK significa células renais de hamster bebê, HA significa o gene da hemaglutinina, GFP significa o gene da proteína fluorescente verde, N significa o nucleocapsídeo, FACS significa o separador de células ativadas por fluorescência, IRES significa o sítio de entrada interna de ribossomos, pfu significa unidades formadoras de placas, iu significa unidades infecciosas e FBS significa Soro Fetal Bovino. A expressão "número de aminoácido E2 (por exemplo, Lys, Thr, etc.)" indica o aminoácido designado no resíduo designado da proteína E2 e é também

utilizada para se referir aos aminoácidos em resíduos específicos nas proteínas E3 ou E1.

[0021] Como utilizado aqui, o termo "alfavírus" possui seu significado convencional na técnica e inclui as várias espécies tais como o Vírus VEE, o Vírus Semliki Forest (SFV), Sindbis, o Vírus Ross River, o Vírus da Encefalite Equina do Oeste, o Vírus da Encefalite Equina do Leste, o Vírus Chikungunya, S.A. AR86, o Vírus Everglades, o Vírus Mucambo, o Vírus Barmah, o Vírus Middelburg, o Vírus Pixuna, o Vírus O'nyong-nyong, o Vírus Getah, o Vírus Sagiyama, o Vírus Bebaru, o Vírus Mayaro, o Vírus Una, o Vírus Aura, o Vírus Whataroa, o Vírus Banbanki, o Vírus Kyzylagach, o Vírus Highlands J, o Vírus Fort Morgan, o Vírus Ndumu e o Vírus Buggy Creek. Os alfavírus preferidos utilizados nos constructos e nos métodos da invenção reivindicada são VEE, S.A. AR86, Sindbis (por exemplo, TR339, ver a Patente U.S. Nº 6.008.035) e SFV.

[0022] Os termos "seqüência de reconhecimento da replicação do alfavírus 5'" e "seqüência de reconhecimento da replicação do alfavírus 3'" se referem às seqüências encontradas no alfavírus ou às seqüências derivadas do mesmo, que são reconhecidas pelas proteínas replicase de alfavírus não estruturais e levam à replicação do RNA viral. Estas são algumas vezes referidas como as extremidades 5' e 3' ou as seqüência 5' e 3' do alfavírus. Nas construções desta invenção, o uso destas extremidades 5' e 3' resultará na replicação da seqüência de RNA codificada entre as duas extremidades. A seqüência de reconhecimento da replicação do alfavírus 3' que é encontrada no alfavírus possui tipicamente aproximadamente 300 nucleotídeos de comprimento, que contém uma seqüência de reconhecimento da replicação 3' mínima mais bem definida. A seqüência de reconhecimento da replicação 3' mínima, conservada entre os alfavírus, é uma seqüência de 19 nucleotídeos (Hill e outros, *J. Virology*, 2693-2704, 1997). Estas se-

qüências podem ser modificadas através de técnicas padrão de biologia molecular para minimizar adicionalmente o potencial de recombinação ou para introduzir sítios de clonagem, contanto que estas tenham que ser reconhecidas pela maquinaria de replicação dos alfavírus.

[0023] O termo "seqüência de reconhecimento da replicação do alfavíru 5' mínima" refere-se à seqüência mínima que permite o reconhecimento pelas proteínas não estruturais do alfavírus, mas não resultam no empacotamento/recombinação significativas das moléculas de RNA que contêm a seqüência. Em uma modalidade preferida, a seqüência de reconhecimento da replicação de alfavírus 5' mínima resulta em um decréscimo de cinquenta até cem vezes na freqüência observada de empacotamento/recombinação do RNA que contém a seqüência. O empacotamento/recombinação dos auxiliares pode ser avaliado através de vários métodos, por exemplo, o método descrito por Lu e Silver (*J. Virol. Methods* 2001, 91(1): 59-65).

[0024] Os termos "replicon de RNA de alfavírus", "RNA do replicon de alfavírus", "replicon do vetor de RNA de alfavírus" e "RNA do replicon do vetor" são utilizados de forma intercambiável para se referirem a uma molécula de RNA que expressa genes de proteínas não-estruturais de forma que esta possa direcionar sua própria replicação (amplificação) e compreende, no mínimo, as seqüências de reconhecimento da replicação de alfavírus 5' e 3' (que podem ser as seqüências mínimas, como definido anteriormente, mas podem alternativamente ser as regiões inteiras do alfavírus), as seqüências codificadas das proteínas não-estruturais do alfavírus e o trato de poliadenilação. Pode conter adicionalmente um promotor ou um IRES. Pode também ser engenheirada para expressar proteínas estruturais do alfavírus. Johnston e outros e Polo e outros (citados no fundamento) descrevem vários constructos para tais replicons de RNA de alfavírus e

tais constructos são incorporados aqui como referência. As modalidades específicas dos replicons de RNA do alfavírus utilizados na invenção reivindicada podem conter uma ou mais mutações atenuadoras, uma mutação atenuadora sendo uma deleção, uma adição ou uma substituição de nucleotídeo de um ou mais nucleotídeos ou uma mutação que compreende o rearranjo ou um constructo quimérico que resulta em uma perda da virulência em um vírus vivo que contém a mutação quando comparado com o alfavírus do tipo selvagem apropriado. Os exemplos de uma substituição de nucleotídeo atenuante (que resulta em uma alteração de aminoácido no replicon) incluem uma mutação na posição do aminoácido 538 de nsP1, na posição de aminoácido 96 de nsP2 ou na posição de aminoácido 372 de nsP2 no alfavírus S.A.AR86 e um exemplo de uma mutação atenuante na região não-codificadora do ácido nucléico do replicon é a substituição de A ou de C no nucleotídeo 3 no VEE.

[0025] O termo "proteína/proteína(s) estrutural(is) do alfavírus" se referem a uma ou a uma combinação de proteínas estruturais codificadas pelo alfavírus. Estas são produzidas pelo vírus na forma de uma poliproteína e são representadas de forma geral na literatura como C-E3-E2-6k-E1. A E3 e a 6k servem como sinais de translocamento/transporte de membranas para as duas glicoproteínas, E2 e E1. Assim, o uso do termo E1 aqui pode se referir a E1, E3-E1, 6k-E1 ou E3-6k-E1 e o uso do termo E2 aqui pode se referir a E2, E3-E2, 6k-E2 ou E3-6k-E2. As mutações atenuadoras podem ser introduzidas em uma ou mais proteínas estruturais do alfavírus.

[0026] O termo "auxiliadora(s)" se refere a uma molécula de ácido nucléico que é capaz de expressar uma ou mais proteínas estruturais do alfavírus.

[0027] Os termos "célula auxiliadora" e "célula de empacotamento" são utilizados aqui de forma intercambiável e se referem à célula na

qual as partículas de replicon do alfavírus são produzidas. A célula auxiliadora compreende um conjunto de auxiliares que codificam uma ou mais proteínas estruturais do alfavírus. Como divulgado aqui, os auxiliares podem ser RNA ou DNA. A célula pode ser qualquer célula que seja permissiva para o alfavírus, isto é, células que são capazes de produzir partículas de alfavírus após a introdução de um produto da transcrição do RNA viral. As células permissivas para o alfavírus incluem, mas não estão limitadas às células Vero, renais de hamster bebê (BHK), 293, 293T, de fibroblastos de embrião de frango (CEF) e de ovário de hamster chinês (CHO). Em certas modalidades da invenção reivindicada, a célula auxiliadora ou de empacotamento pode incluir adicionalmente uma RNA polimerase dependente do RNA heterólogo e/ou uma protease específica à sequência.

[0028] Os termos "partículas de replicon de alfavírus", "partículas de replicon viral" ou "partículas de alfavírus recombinante", utilizados aqui de forma intercambiável, significam um complexo estrutural similar ao vírion que incorpora um RNA de replicon de alfavírus que expressa uma ou mais seqüências heterólogas de RNA. Tipicamente, o complexo estrutural similar ao vírion inclui uma ou mais proteínas estruturais do alfavírus embebidas em um envelope lipídico que circunda um nucleocapsídeo que por sua vez circunda o RNA. O envelope lipídico é tipicamente derivado da membrana plasmática da célula na qual as partículas são produzidas. Preferencialmente, o RNA do replicon do alfavírus é circundado por uma estrutura de nucleocapsídeo compreendida da proteína do capsídeo do alfavírus e as glicoproteínas do alfavírus ficam embebidas no envelope lipídico derivado da célula. As proteínas estruturais e o RNA do replicon podem ser derivados do mesmo ou de um alfavírus diferente. Em uma modalidade específica, o RNA do replicon é derivado do VEE e as proteínas estruturais são derivadas do Vírus Sindbis (ver, por exemplo, Dubensky e outros, Paten-

te U.S. Nº 6.376.236). As partículas de replicon do alfavírus são infecciosas, mas são defeituosas em relação à propagação, isto é, o RNA do replicon não pode se propagar além da célula hospedeira à qual as partículas infectam inicialmente, na ausência do(s) ácido(s) nucléico(s) auxiliador(es) que codifica(m) as proteínas estruturais do alfavírus.

[0029] "Constructos auxiliadores", isto é, moléculas de DNA recombinantes que expressam as proteínas estruturais do alfavírus, podem ser geradas partindo de um único auxiliador que se resolve em duas moléculas separadas *in vivo*. Assim, a vantagem de utilizar um único auxiliador em termos de facilidade de produção e de eficiência de produção é conservada, enquanto as vantagens de um sistema auxiliador bipartido são capturadas na ausência do emprego de um sistema de expressão bipartido. Um constructo auxiliador de DNA pode ser utilizado, enquanto em um segundo conjunto um vetor auxiliador de RNA é utilizado. No caso dos constructos auxiliadores de DNA que não empregam sinais de reconhecimento alfavirais para a replicação e para a transcrição, a frequência teórica de recombinante é menor que a dos sistemas auxiliadores de RNA bipartidos que empregam tais sinais.

[0030] Um promotor para direcionar a transcrição do RNA partindo do DNA, isto é, uma RNA polimerase dependente de DNA, é empregado para produzir o replicon de alfavírus e os ácidos nucléicos auxiliadores da presente invenção. No presente contexto, um promotor é uma seqüência de nucleotídeos reconhecida por uma polimerase e suficiente para causar a transcrição de uma seqüência (a jusante) associada. Em algumas modalidades da invenção reivindicada, o promotor é constitutivo (ver abaixo). Alternativamente, o promotor pode ser regulado, isto é, não atua de forma constitutiva para causar a transcrição da seqüência associada. Se for induzível, estão presentes seqüências que medeiam a regulação da expressão de forma que a se-

seqüência associada é transcrita somente quando (i) uma molécula indutora estiver presente no meio dentro ou sobre o qual as células são cultivadas ou (ii) as condições às quais as células são expostas são alteradas para serem condições indutoras. No presente contexto, uma seqüência reguladora da transcrição inclui uma seqüência promotora e pode incluir ainda seqüências ativas em cis para a expressão regulada de uma seqüência associada em resposta a sinais ambientais.

[0031] Nas modalidades dos auxiliares de RNA e para a produção do RNA do replicon, o promotor é utilizado para sintetizar o RNA em uma reação de transcrição *in vitro* e promotores específicos adequados para este uso incluem os promotores SP6, T7 e da RNA polimerase do T3. Nas modalidades do auxiliador de DNA, o promotor atua dentro de uma célula para direcionar a transcrição do RNA. Os promotores potenciais para a transcrição *in vivo* do constructo incluem promotores eucarióticos tais como os promotores da RNA polimerase II, os promotores da RNA polimerase III ou os promotores virais tais como de MMTV e de MoSV LTR, da região inicial do SV40, do RSV ou do CMV. Muitos outros promotores de mamíferos e virais adequados para a presente invenção estão disponíveis na técnica. Alternativamente, os promotores da RNA polimerase dependente do DNA de bactérias ou de bacteriófagos, por exemplo, SP6, T7 e T3, podem ser empregados para uso *in vivo*, com o RNA polimerase de combinação sendo fornecido para a célula, por um plasmídeo, um vetor de RNA ou um vetor viral separado. Em uma modalidade específica, o RNA polimerase de combinação pode ser transformada de forma estável em uma linhagem de células auxiliares sob o controle de um promotor que pode ser induzido.

[0032] Os constructos de DNA que atuam dentro de uma célula podem funcionar como plasmídeos autônomos transfectados na célula ou podem ser transformados de forma estável no genoma. Nestas

modalidades, o promotor pode ser um promotor constitutivo, isto é, um promotor que, quando introduzido em uma célula e ligado de forma operacional a uma seqüência a jusante, direciona a transcrição da seqüência a jusante após a introdução na célula, sem a necessidade da adição de moléculas indutoras ou uma alteração para induzir as condições. Alternativamente, o promotor pode ser induzível, de forma que a célula produzirá somente o RNA mensageiro funcional codificado pelo constructo quando a célula for exposta ao estímulo apropriado (indutor). Quando se utiliza um promotor que pode ser induzido, os constructos auxiliares são introduzidos na célula empacotadora concomitantemente com, antes ou depois da exposição ao indutor e a expressão das proteínas estruturais do alfavírus ocorre quando tanto os constructos quanto o indutor estão presentes. Alternativamente, os constructos planejados para funcionarem dentro de uma célula podem ser introduzidas na célula através de um vetor viral, por exemplo, de adenovírus, poxvírus, vírus associado a adeno, SV40, retrovírus, nodavírus, picornavírus, vírus da estomatite vesicular e baculovírus com os promotores da pol II de mamíferos.

[0033] Uma vez que um produto da transcrição do RNA (mRNA) que codifica os vetores auxiliares ou do replicon de RNA desta invenção estiver presente na célula auxiliadora (através de abordagens *in vitro* ou *in vivo*, como descrito anteriormente), este é eventualmente traduzido para produzir os polipeptídeos ou as proteínas codificadas. Em certas modalidades, o replicon do vetor de RNA é transcrito *in vitro* partindo de um plasmídeo de DNA e então introduzido na célula auxiliadora através de eletroporação. Em outras modalidades, o replicon do vetor de RNA desta invenção é transcrito *in vivo* partindo de um plasmídeo vetorial de DNA que é transfectado na célula auxiliadora (por exemplo, ver a Patente U.S. Nº 5.814.482) ou é fornecido para a célula auxiliadora através de um vírus ou de uma partícula similar a um vírus.

[0034] O replicon do vetor de RNA do alfavírus é planejado para expressar uma ou mais seqüências codificadoras heterólogas ou um ou mais RNAs funcionais de interesse, também referidos aqui como um RNA heterólogo ou uma seqüência heteróloga, que podem ser escolhidos de uma ampla variedade de seqüências derivadas de vírus, procariotos ou eucariotos. Os exemplos de categorias de seqüências heterólogas incluem, mas não estão limitados aos imunógenos (incluindo proteínas, peptídeos, epítopos ou fragmentos imunogênicos antigênicos nativos, modificados ou sintéticos), citocinas, toxinas, proteínas terapêuticas, enzimas, seqüências anti-sentido e moduladores da resposta imunológica.

[0035] Quaisquer aminoácidos que ocorram nas seqüências de aminoácidos referidas no relatório descritivo, possuem suas abreviações usuais de três e de uma letra utilizadas rotineiramente na técnica: A, Ala, Alanina; C, Cys, Cisteína; D, Asp, Ácido Aspártico; E, Glu, Ácido Glutâmico; F, Phe, Fenilalanina; G, Gly, Glicina; H, His, Histidina; I, Ile, Isoleucina; K, Lys, Lisina; L, Leu, Leucina; M, Met, Metionina; N, Asn, Asparagina; P, Pro, Prolina; Q, Gln, Glutamina; R, Arg, Arginina; S, Ser, Serina; T, Thr, Treonina; V, Val, Valina; W, Try, Triptofano; Y, Tyr, Tirosina.

[0036] Como utilizado aqui, a expressão direcionada por uma seqüência particular é a transcrição de uma seqüência a jusante associada. Se apropriado e desejado para a seqüência associada, o termo expressão também abrange a tradução (síntese de proteína) do RNA transcrito ou introduzido. Alternativamente, seqüências diferentes podem ser utilizadas para direcionar a transcrição e a tradução.

[0037] As células permissivas para o alfavírus empregadas nos métodos da presente invenção são células que, após a transfecção com um produto da transcrição do RNA viral completo, são capazes de produzir partículas virais. Os alfavírus possuem uma faixa ampla de

hospedeiros. Os exemplos de células empacotadoras adequadas incluem, mas não estão limitadas às células Vero, às células renais de hamster bebê (BHK), às células de fibroblastos de embrião de frango, DF-1, 293, 293T, às células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) e às células de insetos.

[0038] A expressão "proteína estrutural" ou "proteína estrutural de alfavírus" como utilizada aqui, se refere a uma ou mais proteínas codificadas pelo alfavírus que são necessárias para o empacotamento do replicon de RNA e tipicamente incluem a proteína do capsídeo, a glicoproteína E1 e a glicoproteína E2 no alfavírus maduro (certos alfavírus, tal como o Vírus Semliki Forest, contêm uma proteína adicional, E3, no revestimento maduro). O termo "proteína(s) estrutural(is) do alfavírus" se refere a uma ou a uma combinação das proteínas estruturais codificadas pelo alfavírus. Estas são sintetizadas (partindo do genoma viral) na forma de uma poliproteína e são geralmente representadas na literatura como C-E3-E2-6k-E1. A E3 e 6k servem como sinais para o translocamento/transporte por membranas para as duas glicoproteínas, E2 e E1. Assim, o uso do termo E1 aqui pode se referir a E1, E3-E1, 6k-E1 ou E3-6k-E1 e o uso do termo E2 aqui pode se referir a E2, E3-E2, 6k-E2 ou E3-6k-E2.

[0039] Como descrito aqui, as proteínas estruturais do alfavírus são distribuídas entre uma ou mais moléculas de ácido nucléico auxiliaadoras (por exemplo, um primeiro RNA (ou DNA) auxiliador e um segundo RNA (ou DNA) auxiliador). Em adição, uma ou mais proteínas estruturais podem ficar localizadas na mesma molécula que o ácido nucléico do replicon, contanto que pelo menos uma proteína estrutural seja deletada do RNA do replicon de forma que o replicon e a partícula de alfavírus resultante sejam defeituosos em relação à replicação. Como utilizado aqui, o termo "deletado(a)" ou "deleção" significa a deleção total do segmento especificado ou a deleção de uma parte sufi-

ciente do segmento especificado para tornar o segmento inoperante ou não-funcional, de acordo com o uso padrão. Ver, por exemplo, a Patente U.S. Nº 4.650.764 a Temin e outros. O termo "defeituoso em relação à replicação" como utilizado aqui é sinônimo ao "defeituoso em relação à propagação" e significa que as partículas produzidas em uma certa célula hospedeira não podem produzir partículas de progênie na célula hospedeira, por causa da ausência da função auxiliadora, isto é, das proteínas estruturais do alfavírus necessárias para o empacotamento do ácido nucléico do replicon. Entretanto, o ácido nucléico do replicon é capaz de se replicar e ser expresso dentro da célula hospedeira na qual foi introduzido.

[0040] A célula auxiliadora, também referida como uma célula de empacotamento, utilizada para produzir partículas de alfavírus defeituosas em relação à replicação infecciosas tem que expressar ou ser capaz de expressar proteínas estruturais de alfavírus suficientes para empacotar o ácido nucléico do replicon. As proteínas estruturais podem ser produzidas partindo de um conjunto de RNAs, tipicamente dois que são introduzidos na célula auxiliador concomitantemente ou antes da introdução do vetor do replicon. O primeiro RNA auxiliador inclui um RNA que codifica pelo menos uma proteína estrutural do alfavírus, mas não codifica todas as proteínas estruturais do alfavírus. O primeiro RNA auxiliador pode compreender um RNA que codifica a glicoproteína E1 do alfavírus, mas não codifica a proteína de capsídeo do alfavírus e a glicoproteína E2 do alfavírus. Alternativamente, o primeiro RNA auxiliador pode compreender um RNA que codifica a glicoproteína E2 do alfavírus, mas não codifica a proteína do capsídeo do alfavírus e a glicoproteína E1 do alfavírus. Em uma modalidade adicional, o primeiro RNA auxiliador pode compreender um RNA que codifica a glicoproteína E1 do alfavírus e a glicoproteína E2 do alfavírus, mas não a proteína do capsídeo do alfavírus. Em uma quarta modali-

dade, o primeiro RNA auxiliador pode compreender um RNA que codifica o capsídeo do alfavírus, mas nenhuma das glicoproteínas do alfavírus. Em uma quinta modalidade, o primeiro RNA auxiliador pode compreender um RNA que codifica o capsídeo e uma das glicoproteínas, isto é E1 ou E2, mas não ambas.

[0041] Em combinação com um destes primeiros RNAs auxiliadores, o segundo RNA auxiliador codifica pelo menos uma proteína estrutural de alfavírus não codificada pelo primeiro RNA auxiliador. Por exemplo, quando o primeiro RNA auxiliador codificar somente a glicoproteína E1 do alfavírus, o segundo RNA auxiliador pode codificar uma ou tanto a proteína do capsídeo do alfavírus quanto a glicoproteína E2 do alfavírus. Quando o primeiro RNA auxiliador codificar somente a proteína do capsídeo do alfavírus, o segundo RNA auxiliador pode incluir um RNA que codifica uma ou ambas as glicoproteínas do alfavírus. Quando o primeiro RNA auxiliador codificar somente a glicoproteína E2 do alfavírus, o segundo RNA auxiliador pode codificar uma ou tanto a proteína do capsídeo de alfavírus quanto a glicoproteína E1 do alfavírus. Quando o primeiro RNA auxiliador codificar tanto o capsídeo quanto a glicoproteína E1 do alfavírus, o segundo RNA auxiliador pode incluir um RNA que codifica uma ou tanto a proteína do capsídeo quanto a glicoproteína E2 do alfavírus.

[0042] Em todos os ácidos nucléicos auxiliadores, entende-se que estas moléculas compreendem ainda seqüências necessárias para a expressão (que abrange a tradução e quando apropriado, sinais de transcrição ou de replicação) das seqüências das proteínas estruturais codificadas nas células auxiliadoras. Tais seqüências podem incluir, por exemplo, promotores (virais, procarióticos ou eucarióticos, induzíveis ou constitutivos) e seqüências de reconhecimento da replicase viral 5' e 3'. No caso dos ácidos nucléicos auxiliadores que expressam uma ou mais glicoproteínas, é entendido partindo da técnica que estas

seqüências são vantajosamente expressas com uma seqüência líder ou sinal no terminal N da região codificadora de proteínas estruturais nos constructos de ácidos nucléicos. A seqüência líder ou sinal pode ser derivada do alfavírus, por exemplo, E3 ou 6k ou pode ser uma seqüência heteróloga tal como um peptídeo sinal ativador de plasminogênio de tecido ou uma seqüência sintética. Assim, como um exemplo, um primeiro ácido nucléico auxiliar pode ser uma molécula de RNA que codifica capsídeo-E3-E1 e o segundo ácido nucléico auxiliar pode ser uma molécula de RNA que codifica capsídeo-E3-E2. Alternativamente, o primeiro RNA auxiliador pode codificar somente o capsídeo e o segundo RNA auxiliador pode codificar E3-E2-6k-E1. Adicionalmente, o sinal de empacotamento ou a "seqüência de encapsulamento" que está presente no genoma viral não está presente em todos os ácidos nucléicos auxiliadores. Preferencialmente, o sinal de empacotamento é deletado de todos os ácidos nucléicos auxiliadores.

[0043] Estes auxiliadores de RNA podem ser introduzidos nas células de várias maneiras. Podem ser expressos partindo de um ou mais cassetes de expressão que foram transformados de forma estável nas células, estabelecendo assim linhagem de células de empacotamento (ver, por exemplo, a Patente U.S. Nº 6.242.259). Alternativamente, os RNAs podem ser introduzidos na forma de moléculas de RNA ou de DNA que podem ser expressas na célula auxiliadora sem a integração no genoma celular. Os métodos de introdução incluem a eletroporação, os vetores virais (por exemplo, SV40, adenovírus, novavírus, astrovírus) e a transfecção mediada por lipídeos.

[0044] Uma alternativa para vários RNAs auxiliadores é o uso de uma única molécula de DNA, que codifica todos os polipeptídeos necessários para o empacotamento do RNA do replicon viral em partículas de replicon de alfavírus infecciosas. O único DNA auxiliador pode ser introduzido na célula de empacotamento através de quaisquer

meios conhecidos na técnica, incluindo, mas não limitados à eletroporação, à transfecção mediada por lipídeos (lipofecção), os vetores virais (por exemplo, adenovírus ou SV-40) ou a transfecção mediada pelo fosfato de cálcio. Preferencialmente, o DNA é introduzido através de métodos baseados na eletroporação desta invenção. O DNA é tipicamente submetido à eletroporação nas células com um decréscimo na voltagem e um aumento na capacitância, quando comparados às necessárias para a captação de RNA. Em todas as eletroporações, o valor para a voltagem e para a capacitância tem que ser ajustado de forma a evitar a destruição da capacidade das células de empacotamento (hospedeiras) de produzirem partículas de alfavírus infecciosas. Alternativamente, a função auxiliadora, neste formato e sob um promotor que pode ser induzido, pode ser incorporada no genoma da célula de empacotamento antes da introdução/expressão do replicon do vetor de RNA e então induzida com o estímulo apropriado logo antes, de forma concomitante ou após a introdução do replicon do vetor de RNA.

[0045] Vantajosamente, um ou mais ácidos nucleicos que codificam as proteínas estruturais do alfavírus, isto é, o capsídeo, a glicoproteína E1 e a glicoproteína E2 ou o constructos do replicon, contêm uma ou mais mutações atenuadoras. As expressões "mutação atenuadora" e "aminoácido atenuador", como utilizadas aqui, significam uma mutação de nucleotídeo (que pode ou não ocorrer em uma região do genoma viral que codifica polipeptídeos) ou um aminoácido codificado por uma mutação de nucleotídeo, que no contexto de um vírus vivo, resulta em uma probabilidade menor do alfavírus causar a doença em seu hospedeiro (isto é, uma perda da virulência), de acordo com a terminologia padrão na técnica, Ver, por exemplo, B. Davis, e outros, *Microbiology* 156-158, (4ª ed. 1990), seja a mutação uma mutação de substituição ou uma deleção em quadro ou uma mutação de adição. A expressão "mutação atenuadora" exclui mutações que seriam letais

aos vírus, a não ser que tal mutação seja utilizada em combinação com uma mutação de "restauração" que torna o vírus viável, apesar de atenuado. Os métodos para a identificação de mutações atenuadoras adequadas no genoma do alfavírus são conhecidos na técnica. Olmsted e outros (1984; *Science* 225:424) descrevem um método de identificação de mutações atenuadoras no vírus Sindbis através da seleção em relação ao crescimento rápido na cultura de células. Johnston e Smith (1988; *Virology* 162:437) descrevem a identificação das mutações atenuadoras no VEE através da aplicação da pressão seletiva direta para a penetração acelerada das células BHK. As mutações atenuadoras nos alfavírus foram descritas na técnica, por exemplo, White e outros 2001 *J. Virology* 75:3706; Kinney e outros 1989 *Virology* 70:19; Heise e outros 2000 *J. Virology* 74:4207; Bernard e outros 2000 *Virology* 276:93; Smith e outros 2001 *J. Virology* 75:11196; Heidner e Johnston 1994 *J. Virology* 68:8064; Klimstra e outros 1999 *J. Virology* 73:10387; Glasgow e outros 1991 *Virology* 185:741; Polo e Johnston 1990 *J. Virology* 64:4438; e Smerdou e Liljestrom 1999 *J. Virology* 73:1092.

[0046] Em certas modalidades, o RNA do replicon compreende pelo menos uma mutação atenuadora. Em outras modalidades específicas, o(s) ácido(s) nucléico(s) auxiliador(es) inclui(em) pelo menos uma mutação atenuadora. Nas modalidades que compreendem duas moléculas de ácidos nucléicos auxiliaadoras, pelo menos uma molécula inclui pelo menos uma mutação atenuadora ou ambas podem codificar pelo menos uma mutação atenuadora. Alternativamente, o ácido nucléico auxiliador ou pelo menos um do primeiro ou do segundo ácido nucléico auxiliador inclui pelo menos duas ou várias mutações atenuadoras. As mutações atenuadoras apropriadas dependem do alfavírus utilizado. Por exemplo, quando o alfavírus foi o VEE, mutações atenuadoras adequadas podem ser selecionadas do grupo que consiste em

códons na posição de aminoácido 76 da E2 que especificam um aminoácido atenuador, preferencialmente a lisina, a arginina ou a histidina como o aminoácido 76 da E2; os códons na posição de aminoácido 120 da E2 que especificam um aminoácido atenuador, preferencialmente a lisina como o aminoácido 120 da E2; os códons na posição de aminoácido 209 da E2 que especificam um aminoácido atenuador, preferencialmente a lisina, a arginina ou a histidina como o aminoácido 209 da E2; os códons no aminoácido 272 da E1 que especificam uma mutação atenuadora, preferencialmente a treonina ou a serina como o aminoácido 272 da E1; os códons no aminoácido 81 da E1 que especificam uma mutação atenuadora, preferencialmente a isoleucina ou a leucina como o aminoácido 81 da E1; e os códons no aminoácido 253 da E1 que especificam uma mutação atenuadora, preferencialmente a serina ou a treonina como o aminoácido 253 da E1. Mutações atenuadoras adicionais incluem deleções ou mutações de substituição no domínio de clivagem entre E3 e E2 de forma que a poliproteína E3/E2 não é clivada; esta mutação em combinação com a mutação em E1-253 é uma cepa atenuada preferida para uso nesta invenção. Similarmente, as mutações presentes nas cepas vacinais vivas existentes, por exemplo, a cepa TC83 (ver Kinney e outros, 1989, *Virology* 170: 19-30, particularmente a mutação no nucleotídeo 3), são também vantajosamente empregadas nas partículas purificadas pelos métodos desta invenção.

[0047] Quando o alfavírus for o Arbovírus da África do Sul Nº 86 (S.A. AR86), as mutações atenuadoras adequadas podem ser selecionadas do grupo que consiste em códons na posição de aminoácido 538 de nsP1 que especificam um aminoácido atenuador, preferencialmente a isoleucina como o aminoácido 538 de nsP1; os códons na posição de aminoácido 304 da E2 que especificam um aminoácido atenuador, preferencialmente a treonina como a posição de aminoácido

304 da E2; códons na posição do aminoácido 314 da E2 que especificam um aminoácido atenuador, preferencialmente a lisina como o aminoácido 314 da E2; códons na posição do aminoácido 376 da E2 que especificam um aminoácido atenuador, preferencialmente a alanina como o aminoácido 376 da E2; códons na posição do aminoácido 372 da E2 que especificam um aminoácido atenuador, preferencialmente a leucina como o aminoácido 372 da E2; códons na posição do aminoácido 96 de nsP2 que especificam um aminoácido atenuador, preferencialmente a glicina como o aminoácido 96 de nsP2; e códons na posição do aminoácido 372 de nsP2 que especificam um aminoácido atenuador, preferencialmente a valina como o aminoácido 372 de nsP2. As mutações atenuadoras adequadas úteis nas modalidades em que outros alfavírus são empregados, são conhecidas pelos versados na técnica.

[0048] As mutações atenuadoras podem ser introduzidas no RNA através da realização da mutagênese direcionada ao sítio no cDNA que codifica o RNA, de acordo com procedimentos conhecidos. Ver, Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488 (1985), cuja descrição é incorporada aqui como referência em sua totalidade. Alternativamente, as mutações podem ser introduzidas no RNA através da substituição de fragmentos de restrição homólogos no cDNA que codifica o RNA, de acordo com os procedimentos conhecidos ou nas cópias de cDNA utilizando métodos mutagênicos de reação em cadeia da polimerase.

[0049] A presente invenção fornece métodos melhorados para a preparação de partículas de replicon de alfavírus altamente imunogênicas defeituosas em relação à propagação infecciosas em altos rendimentos. Nas partículas de replicon de alfavírus (ARPs), um vetor de alfavírus, referido aqui como um replicon, é engenheirado para conter e expressar um ou mais genes de interesse, em que o gene de interesse pode codificar, por exemplo, um antígeno, uma quimiocina, uma

citocina, uma ribozima ou uma enzima. O vetor do replicon do alfavírus pode ser derivado de qualquer alfavírus, tal como o vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEE), o vírus Sindbis, por exemplo, a cepa TR339, o Arbovírus Sul Africano Nº 86 e o vírus Semliki Forest, dentre outros. O vetor é então introduzido nas células em cultura que permitem a replicação do alfavírus e em que as proteínas estruturais do alfavírus também são expressas, de forma que o vetor é empacotado pelas proteínas estruturais em ARPs que são eventualmente liberadas da célula. A presente invenção também pode ser aplicada na preparação e na coleta de partículas de alfavírus atenuadas vivas, incluindo as partículas que são descritas na Patente U.S. Nº 5.643.576 e cepas de alfavírus atenuadas utilizadas como vacinas contra o alfavírus.

[0050] Devido ao fato de que os métodos tradicionais de produção e de coleta da ARP serem onerosos, ineficientes e muito trabalhosos, os presentes inventores examinaram vários parâmetros para atingir um maior rendimento das ARPs enquanto simplificam o método e diminuem os custos por ARP. O novo método envolve inovações nas etapas da preparação de ácidos nucleicos, de cultura de células, de manipulação de células para produzir as ARPs, de coleta das ARPs e de formulação das ARPs e este método possui o benefício de aumentar os rendimentos das ARPs e de reduzir significativamente os custos por ARP.

[0051] Em todos os relatos anteriores, as ARPs foram purificadas do meio ou do sobrenadante de cultura, em que as células que produzem as ARPs foram cultivadas. Surpreendentemente, quando os presentes inventores lavaram as células produtoras de ARPs com uma solução aquosa contendo um sal a uma concentração superior à tipicamente empregada no meio de crescimento normal, um número significativo de ARPs infecciosos foi liberado das células e/ou dos restos celulares. A capacidade imunogênica das ARPs coletadas após a eta-

pa de lavagem com sal foi comparada com a das ARPs produzidas de acordo com métodos conhecidos e a força de resposta para as ARPs coletadas com a lavagem com sal era tão boa como ou melhor que a para as partículas de ARPs liberadas inicialmente no meio antes da lavagem com sal.

[0052] Em muitas aplicações, o uso do método de lavagem com sal para coletar as ARPs, como descrito aqui, pode tornar óbvia a necessidade de coletar as ARPs do meio de cultura de células, por causa do grande número de partículas retidas pelas células antes da lavagem com sal. A proporção das ARPs presentes no meio antes de uma lavagem com sal em relação às ARPs retidas pelas células e liberadas com a lavagem com sal pode ser de 1:1 até 1:400, dependendo dos tipos de células, das condições de crescimento das células e das condições de lavagem com sal. Nas células Vero, a proporção é tipicamente de pelo menos 1:3, mais comumente de 1:10, 1:100 ou 1:400 (ver a Figura 4), dependendo do grau de otimização dos outros parâmetros da invenção reivindicada.

[0053] Portanto, são divulgados aqui métodos para a preparação das ARPs que compreendem as etapas de (a) introdução de um ácido nucléico de replicon alfaviral em uma célula hospedeira, o dito ácido nucléico do replicon contendo pelo menos um sinal de empacotamento para o alfavírus e pelo menos uma seqüência codificadora para um ou mais genes de interesse que podem ser expressos no dito ácido nucléico de replicon alfaviral, em que a célula hospedeira ainda é capaz de expressar proteínas estruturais do alfavírus necessárias para a produção das ARPs, para produzir uma célula hospedeira modificada; (b) crescimento da dita célula hospedeira modificada em um meio sob condições que permitem a expressão das proteínas estruturais e a replicação do ácido nucléico do replicon alfaviral e então o empacotamento do ácido nucléico do replicon alfaviral para formar as ARPs; (c)

separação das células hospedeiras modificadas do meio e (d) contato das células hospedeiras modificadas após a etapa (c) com uma solução tamponada possuindo uma força iônica de pelo menos aproximadamente 0,20 M (aqui como o "Meio de Liberação") para liberar as ARPs e produzir uma solução contendo as ARPs.

[0054] A etapa (d) pode ser realizada com qualquer um de um número de Meios de Liberação diferentes e o rendimento da "lavagem com sal" das ARPs (isto é, as ARPs coletadas no Meio de Liberação) será em parte uma função do período de tempo durante o qual as células são expostas ao Meio de Liberação. Este período de tempo pode ser de 1 minuto até várias horas; 5 até 20 minutos são típicos. Em uma modalidade preferida, é utilizada uma solução de sal a 0,5 M e as células são incubadas nesta solução durante aproximadamente 5 minutos. A combinação ótima de concentração de sal no Meio de Liberação e do tempo de incubação pode ser determinada diretamente por um versado na técnica e será adicionalmente uma função do tipo de células e do dispositivo de suporte das células.

[0055] A observação surpreendente de que muitas das ARPs ficam retidas nas células fornece a oportunidade de lavar as células vigorosamente antes da liberação das ARPs das células em uma solução contendo sal, reduzindo significativamente assim a necessidade de uma purificação a montante das ARPs. As monocamadas de células são assim utilizadas eficientemente como uma matriz de afinidade para as ARPs.

[0056] Assim, em uma modalidade preferida, as células são cultivadas como descrito na etapa (b) anterior, em um receptáculo, tal como um frasco de cultura de células, uma garrafa rolante, um dispositivo em cuba de células, um recipiente de cultura (incluindo frascos de biorreatores e giratórios) com contas para o crescimento de células aderidas ou um dispositivo de fibra côncava, onde é permitido que as

células fiquem incubadas de aproximadamente 12 até 48 horas, preferencialmente 16-24 horas, para gerar as ARPs. No caso em que são utilizadas células de mamíferos, as células tipicamente se aderem às superfícies internas dos receptáculos ou a outro suporte sólido, incluindo, mas não limitado, a contas, partículas de poliestireno, fibras côncavas e similares e após o período de incubação necessário, o meio de cultura é desejavelmente removido (decantado, aspirado ou similar) das células e é reservado ou descartado, separando assim as células hospedeiras modificadas do meio de cultura de células. Alternativamente, as células que crescem em cultura em suspensão podem ser centrifugadas para remover as células do meio de crescimento. As células podem então ser lavadas extensivamente em uma solução de "Lavagem de Células", que é um meio contendo baixa concentração de sal ou nenhum que contém opcionalmente componentes adicionais para auxiliar na remoção de materiais extrínsecos, por exemplo, uma preparação de DNase ou outros reagentes químicos que removem o DNA celular residual ou as proteinases. Uma DNase disponível comercialmente é a Benzonase, uma desoxirribonuclease de *Serratia marcescens* disponível na Novagen/EMD Biosciences, Madison, WI (ver também a Patente U.S. Nº 5.173.418). Pode ser incorporada no meio pós-eletroporação a uma concentração de aproximadamente 10 até aproximadamente 1000 unidades/mL. Quando a Dnase, por exemplo, a Benzonase, é incorporada na preparação das ARPs, é utilizada a uma concentração de 100 até 5000 unidades por mL, de forma desejável de aproximadamente 500 unidades por mL, com incubação a 30 até 37°C durante 10 até 90 minutos, de forma desejável aproximadamente 30 minutos. Os exemplos de Meios de Liberação úteis (soluções de lavagem de células para a liberação das ARPs ligadas) são apresentados na Figura 4. Estes resultados indicam que a solução de Lavagem de Células pode ser otimizada para cada combinação de cé-

lula - cepa alfaviral para maximizar a retenção das ARPs (ou partículas do alfavírus) pelo substrato celular e minimizar a sua liberação no meio antes da adição do Meio de Liberação. Através da maximização da retenção das ARPs pelas células, pode não ser eficiente ou econômico coletar o número muito menor de partículas presentes nos meios de cultura de células.

[0057] Após esta lavagem extensiva, as células são então expostas ao Meio de Liberação e as ARPs são liberadas neste meio partindo das células hospedeiras. Em modalidades preferidas, o Meio de Liberação é uma solução aquosa contendo pelo menos aproximadamente 0,20 M de sal, preferencialmente entre 0,25 M e 5 M de sal e está tipicamente em um volume muito menor que o volume do meio no qual as células foram cultivadas, por exemplo, uma redução de 10 até 50 vezes no volume. Podem conter componentes adicionais, tal como a DNase, (particularmente se não forem utilizados na solução de Lavagem de Células) e estabilizantes, por exemplo, HSA e sacarose. A temperatura da etapa de liberação não é crítica, resultados similares foram obtidos a 4°C, à temperatura ambiente e a 37°C. Os resultados similares são obtidos com lavagens de sais (no Meio de Liberação) de 10 até 30 min.

[0058] O Meio de Liberação pode ser produzido na força iônica desejada com sais que incluem, mas não estão limitados ao NaCl, ao KCl, ao MgCl₂, ao CaCl₂, ao NH₄Cl, ao sulfato de NH₄, ao acetato de NH₄ e ao bicarbonato de NH₄. De forma desejável, o pH do Meio de Liberação é compatível com a manutenção de integridade das células, por exemplo, de aproximadamente 6 até aproximadamente 9,0 ou de aproximadamente 6,5 até aproximadamente 8,5. Em modalidades específicas, o uso de sais voláteis no Meio de Liberação, tais como os sais de amônio voláteis, especialmente o acetato ou o bicarbonato de amônio, permite que a solução resultante contendo as ARPs seja liofi-

lizada, com o resultado da remoção do sal da preparação concentrada das ARPs.

[0059] Vários sais foram testados em relação as suas capacidades de facilitar a coleta e a recuperação das ARPs das células Vero em 16 e 24 horas pós-eletroporação. 1 M de NaCl em pH 7,2, 1 M de acetato de amônio em pH 7,35, 1 M de bicarbonato de amônio em pH 7,4, 1 M de cloreto de magnésio em pH 7,2, 1 M de acetato de sódio em pH 7,35 e 1 M de sulfato de amônio em pH 7,35 todos forneceram resultados equivalentes e bons. O aumento da concentração de sal no Meio de Liberação de 0,5 M até 5 M não afetou o rendimento das ARPs. A utilização de uma concentração próxima à quantidade eficiente inferior preveniu a necessidade de que volumes diluídos maiores do material fossem carregados nos meios para cromatografia. 20 mM de fosfato de sódio em pH 7,2, 20 mM de fosfato de sódio em pH 6,5, 50 mM de fosfato de sódio em pH 7,2 e 20 mM de fosfato de sódio em pH 7,2 com 0,1% de Tween 80 não serviam para liberar eficientemente as ARPs das células produtoras. Foram realizadas lavagens em Meio de Liberação a 4°C, à temperatura ambiente e a 37°C; a temperatura de lavagem não afetava o rendimento.

[0060] O efeito do meio no qual as células são colocadas imediatamente após a eletroporação, isto é, o meio pós-eletroporação, também foi estudado. Ver o Exemplo 3. Foram obtidos rendimentos surpreendentemente bons utilizando meio sem soro, freqüentemente equivalentes aos do meio contendo soro, oferecendo assim vantagens em relação à segurança potencial dos produtos utilizados ainda na redução da quantidade de proteína potencialmente associada com as células permissivas para o alfavírus e as partículas virais ou as partículas similares a vírus.

[0061] Em uma modalidade específica, o meio de cultura separado das células na etapa (c), como descrito anteriormente, pode ser com-

binado com a solução contendo ARPs descrita anteriormente aqui e as ARPs podem ser purificadas de uma única vez destas duas frações separadas previamente. Alternativamente, as ARPs podem ser purificadas separadamente do meio de cultura e então combinadas com as partículas removidas pela lavagem com sal.

[0062] Em geral, todas as etapas da invenção reivindicada, incluindo o crescimento das células antes da produção das ARPs, podem ser realizadas em meio sem soro.

[0063] Embora muitos métodos sejam conhecidos para a introdução de moléculas de ácidos nucleicos nas células hospedeiras, um método particularmente útil é a eletroporação. Os presentes inventores determinaram que maiores rendimentos das ARPs eram obtidos quando tanto as células quanto a entrada dos ácidos nucleicos nas misturas para eletroporação estavam presentes em concentrações maiores que as recomendadas ou utilizadas anteriormente.

[0064] Geralmente, a função da eletroporação é utilizar um campo elétrico para criar poros ou aberturas nas membranas celulares suficientes para permitir a entrada dos ácidos nucleicos. Estão atualmente disponíveis comercialmente muitos dispositivos para eletroporar células, que incluem cubetas descartáveis (que tipicamente suportam 0,8 e 4 mL de meio), eletrodos de placas de petri e aparatos para passar o fluxo ou outras câmaras para eletroporação. Há um ensinamento extensivo na técnica sobre a otimização destes dispositivos para a eletroporação de células para efetuar a transformação genética, variando parâmetros tais como a voltagem, a duração do pulso, a geometria do dispositivo, a força necessária de campo (que é uma função de cada tipo celular e depende do raio da célula e de sua voltagem de quebra crítica) e da distância entre os eletrodos. Adicionalmente, a densidade das células é também um fator e as recomendações dos fabricantes ficam entre $1 - 5 \times 10^6$ células/mL para células Vero e NIH-3T3 e ligei-

ramente maior para células BHK e CHO, das quais ambas são menores que as células Vero (ver, por exemplo, Multiporator® Cuvette Manual, Brinkmann, Westbury, NY; Genetronics, São Diego, CA (BTX Division) protocols for the ElectroCell Manipulator (ECM®) ou the ElectroSquarePorator®; Parham, J. e outros 1999 *CytoTechnology* 28:1-9). A técnica ensina que densidades maiores de células que as recomendadas resultam em condições não-homogêneas do campo no meio de eletroporação, que pode levar à fusão da célula. Liljestrom e Garoff, *J. Virology* 65:4107-4113, 1991, utilizaram a eletroporação para introduzir um único auxiliador de RNA com cap e um RNA de replicon do Vírus Semliki Forest em células BHK a uma concentração de 5×10^6 células/mL.

[0065] Similarmente, a concentração de ácidos nucleicos utilizada na técnica foi determinada de forma empírica e é geralmente recomendada como estando entre 5 - 20 μg de DNA por mL de tampão para eletroporação; com quantidades maiores consideradas eficientes somente para ácidos nucleicos em grande escala. Liljestrom e Garoff (1991) estudaram o efeito da concentração do RNA na eletroporação e relataram que a eficiência de captação não é linearmente dependente da concentração do RNA e que 2 μg eram suficientes para a obtenção de uma eficiência de transfecção de 100% em uma eletroporação em cubeta.

[0066] Na presente invenção, são obtidos melhores resultados (rendimento de ARP por célula hospedeira) quando a eletroporação é realizada utilizando células hospedeiras a uma densidade de células de aproximadamente 1×10^7 até aproximadamente 1×10^9 por mL de meio para eletroporação. Mais preferencialmente, a densidade celular no meio de eletroporação é de aproximadamente 5×10^7 até 5×10^8 células por mL. Como exemplificado especificamente aqui, a eletroporação é realizada em uma cubeta para eletroporação, mas uma placa

de Petri ou um dispositivo para eletroporação de fluxo contínuo, dos quais ambos estão disponíveis comercialmente, podem ser também utilizados. Outros tipos de câmaras de eletroporação podem ser utilizados. Os resultados melhorados foram obtidos com concentrações de células de aproximadamente 1×10^7 até aproximadamente 5×10^8 por mL. Por exemplo, com 10^8 células em uma cubeta com espaço de 0,4 cm, 10^{10} até 10^{11} ARPs foram obtidas partindo de um único evento de eletroporação. Os rendimentos equivalentes em uma base de células e de volume podem ser obtidos escalonando apropriadamente os parâmetros em outros dispositivos para eletroporação. Alternativamente, as células CHO, BHK, CEF, 293T e de fibroblastos de embrião de frango podem ser utilizadas. As células de insetos cultivadas, como discutido anteriormente aqui, também podem ser utilizadas.

[0067] Com uma faixa de concentração de células otimizada para a eletroporação do auxiliador de replicon, cada RNA auxiliador de entrada está presente em aproximadamente 10 até 50, de forma desejável aproximadamente 35 microgramas por mL ($\mu\text{g/mL}$) e o RNA do replicon está presente em 10 até 150 $\mu\text{g/mL}$, de forma desejável aproximadamente 35 $\mu\text{g/mL}$. Em outras modalidades, um ou mais auxiliadores de DNA são utilizados. A concentração dos auxiliadores de DNA utilizada na eletroporação é tipicamente maior que a utilizada para os auxiliadores de RNA, por exemplo, entre 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$. Utilizando auxiliadores de RNA ou de DNA, a quantidade do replicon de RNA do alfavírus adicionada às células antes da eletroporação é aproximadamente pelo menos 35 $\mu\text{g/mL}$.

[0068] Assim, é divulgado aqui um método para a preparação das ARPs que compreendem a introdução de um vetor de replicon de alfavírus em uma cultura de células permissivas para o alfavírus através da eletroporação, em que a concentração das células no meio de cultura durante a eletroporação é de pelo menos 10^7 células/mL de meio,

preferencialmente entre 5×10^7 e 5×10^8 células/mL de meio. Embora os métodos preferidos da invenção reivindicada envolvam o uso de um RNA de replicon que é então introduzido na célula, uma abordagem alternativa é introduzir o RNA do replicon através de uma molécula de cDNA que codifica o RNA do replicon. Esta abordagem é algumas vezes referida como um sistema eucariótico de iniciação de vetor em camadas (ELVIS), que é descrito nas Patentes U.S. Nºs 5.814.482 e 6.015.686.

[0069] As proteínas estruturais do alfavírus produzidas na célula hospedeira podem ser codificadas por uma ou mais seqüências de ácidos nucleicos integradas de forma estável dentro do genoma da dita célula hospedeira ou podem ser introduzidas na célula hospedeira em uma forma transitória, simultaneamente a ou antes da introdução do ácido nucleico do replicon do alfavírus. De forma desejável, as proteínas estruturais do alfavírus fornecidas na célula hospedeira são expressas partindo de uma ou duas moléculas de ácido nucleico (RNA ou DNA), que codificam uma proteína de capsídeo de alfavírus capaz de se ligar a um ácido nucleico de replicon de alfavírus e pelo menos uma glicoproteína do alfavírus, em que a dita glicoproteína do alfavírus se associa com o ácido nucleico do replicon do alfavírus e a proteína do capsídeo. Quando adicionada na forma de ácidos nucleicos através da eletroporação, tal um ou mais ácidos nucleicos auxiliares podem ser co-eletroporados com o RNA do replicon. Na prática do método desta invenção com um único ácido nucleico auxiliar, uma faixa útil para a proporção molar do RNA do replicon : ácido nucleico auxiliar fica entre 1:2 e 1:8 e uma faixa ampla para a proporção molar do RNA do replicon : primeiro auxiliar : segundo auxiliar fica entre 1:2:2 e 1:5:5. Geralmente, a concentração de cada auxiliar pode ser otimizada através de experimentos de rotina e não é necessário ou esperado que ambos os auxiliares sejam utilizados em quantidades equi-

molares, particularmente se um auxiliador for uma molécula de RNA e um outro auxiliador for uma molécula de DNA. As quantidades da(s) molécula(s) auxiliador(as) podem ser aumentadas, em relação à quantidade de ácido nucléico do replicon, mas independentemente um do outro, no caso de dois auxiliadores, para determinar a concentração do(s) auxiliador(es) que gera a maior concentração de ARPs. Em uma modalidade específica de um único auxiliador de DNA que está expressando todas as proteínas estruturais do alfavírus (por exemplo, um auxiliador que expressa todas as proteínas estruturais do VEE possui aproximadamente 8,7 kb de comprimento), uma proporção molar útil de DNA do replicon : auxiliador de DNA é de aproximadamente 1:6. Similarmente, 30 µg do vetor do replicon do VEE que codifica uma proteína gag do HIV e 100 - 150 µg do auxiliador de DNA (promotor do CMV) foram submetidos à eletroporação em células Vero para a produção das ARPs. O DNA foi altamente purificado para remover os contaminantes tóxicos e concentrado até aproximadamente 5 mg/mL antes da eletroporação. Geralmente, é preferível concentrar o DNA até entre 1 e 8 mg/mL, preferencialmente entre 5 e 8 mg/mL. O auxiliador de DNA está presente na mistura para eletroporação em aproximadamente 20-500, de forma desejável de aproximadamente 50 até aproximadamente 300, por exemplo, aproximadamente 150 µg por 0,8 mL de mistura para eletroporação, de forma desejável contendo de aproximadamente 5×10^7 até aproximadamente 2×10^8 células, por exemplo, aproximadamente $1,2 \times 10^8$ células.

[0070] Um aspecto do método eficiente da presente invenção, para as modalidades utilizando replicon e/ou RNA auxiliador, é a realização da transcrição partindo do vetor de DNA linearizado que codifica o replicon e os ácidos nucléicos auxiliadores sem a purificação de tal DNA após a sua linearização através da digestão com enzima de restrição. Foi desenvolvido um protocolo para a digestão pela enzima de restri-

ção e para a transcrição do RNA no mesmo tampão de transcrição do RNA (reação acoplada). O rendimento de RNA, se calculado por peso de DNA de entrada, era de 2 - 3 vezes maior na reação acoplada quando comparado com o dos métodos anteriores em que o DNA era purificado após a linearização e antes da transcrição do RNA.

[0071] A contribuição nas economias adicionais nos custos, nos reagentes e no trabalho a desta invenção vem da descoberta de que o(s) RNA(s) auxiliador(es) sem cap pode(m) ser utilizado(s) na reação de eletroporação. O Exemplo 1 descreve os experimentos que foram realizados para determinar a eficiência do(s) RNA(s) sem cap para uso na eletroporação junto com um RNA do replicon (ver também a Figura 1).

[0072] Foi verificado se uma estrutura de cap era necessária nos RNAs auxiliares para que sejam replicados e para fornecerem proteínas estruturais com as quais empacotam os RNAs do replicon (Exemplo 1). Embora não deva haver uma necessidade teórica para a adição de cap nos RNAs auxiliares, dados existentes dos laboratórios dos inventores assim como outros laboratórios indicaram que os auxiliares sem cap não funcionavam eficientemente (se funcionavam) quando as ARPs eram geradas. Todavia, devido ao custo associado com a adição de cap dos RNAs auxiliares e ao potencial de aumentar significativamente o rendimento do RNA partindo das reações de transcrição se não for utilizado um análogo do cap, os estudos sobre o uso de auxiliares sem cap para gerar as ARPs foram iniciados. As células Vero foram submetidas à eletroporação com o RNA do replicon junto com RNAs auxiliares com cap ou sem cap. Surpreendentemente, ARPs de título equivalente foram geradas com os auxiliares de RNA com cap ou sem cap (Figura 1), contanto que os auxiliares de RNA estivessem suficientemente purificados antes da eletroporação. A produção das ARPs com auxiliares sem cap foi então

tentada em outros tipos de células (células CHO, 293T e DF-1) para confirmar que este resultado não estava limitado às células Vero. Os RNAs auxiliares sem cap foram utilizados para gerar as ARPs em células Vero, CHO, DF-1 e 293T. As ARPs geradas com auxiliares de RNA sem cap eram equivalentes em relação ao título às ARPs geradas com auxiliares de RNA com cap em todos os tipos de células testados (Figura 1). A capacidade de utilizar moléculas de RNA auxiliares sem cap permite economias nos custos significativas em termos de reagentes e de rendimento do RNA. Em contraste, os rendimentos eram maiores para os RNAs de replicon com cap do que para os RNAs de replicon sem cap. Os caps podem incluir cap de G, cap de C, cap de A, G (m⁷G(5'ppp(5')pppG (5)A) metilado; G(G(5'ppp(5')A) não-metilado; ARCA (análogo de cap anti-reverso, 3-O-Me-m⁷G(5')pppG(5)); os reagentes de adição de cap são bem conhecidos na técnica e estão disponíveis comercialmente, por exemplo, na Promega, Madison, WI e Ambion, Austin, TX. O custo da produção do RNA é significativamente diminuído porque o reagente de análogo de cap é um componente oneroso do método e porque cada reação de transcrição produz mais RNA.

[0073] Comparando os resultados com os RNAs purificados e não-purificados na eletroporação, foi determinado que uma purificação do RNA pelo menos parcial (utilizando kits disponíveis comercialmente e métodos que incluem, mas não estão limitados à cromatografia de exclusão de tamanho, à cromatografia em coluna de sílica ou ou LiCl) era necessária para bons rendimentos das ARPs. A purificação remove moléculas tais como o EDTA, o HEPES e o TRIS (constituintes comuns na manipulação de ácidos nucleicos), que são conhecidos por causarem efeitos prejudiciais sobre as eficiências de transfecção obtidas partindo da eletroporação (ver, por exemplo, o manual de instruções de Brinkmann Instruments), assim como os componentes do

tampão de transcrição utilizados para gerar os RNAs (ver o Exemplo 2). As preparações de ácidos nucleicos utilizadas na eletroporação estão preferencialmente em uma proporção de A_{260}/A_{280} de aproximadamente 1,7 até 1,9 e são suspensos em água destilada antes da eletroporação. A purificação do RNA possui a vantagem adicionada de realização de uma concentração das soluções de RNA. Com um volume menor para a solução do RNA que deve ser adicionado às células no meio de eletroporação, mais células podem ser utilizadas na eletroporação. Sem desejar estar ligado a qualquer teoria particular, acredita-se que a remoção do cátion de Mg divalente ou a redução do cátion divalente de Mg a uma concentração menor que 5 mM antes da eletroporação aumenta o rendimento final das ARPs.

[0074] Um único auxiliador de DNA pode ser utilizado para produzir ARPs quando submetido à eletroporação junto com o RNA do replicon do alfavírus que carrega a seqüência de interesse. Embora as eletroporações em onda quadrada e em onda exponencial forneçam resultados similares, quanto maior a pureza do auxiliador de DNA, melhor o rendimento das ARPs. Foi descoberto que uma voltagem menor (com uma capacitância maior) era preferível para introduzir eficientemente as moléculas de DNA nas células, quando comparada com a introdução de apenas moléculas de RNA.

[0075] Após as ARPs terem sido coletadas das células através da lavagem com sal e opcionalmente coletadas do sobrenadante livre de células, as ARPs podem ser purificadas através de uma ou mais etapas incluindo, mas não limitadas à cromatografia de troca iônica e à cromatografia por afinidade à heparina. A cromatografia com heparina parece funcionar com várias das proteínas estruturais de alfavírus mutantes atenuados incorporados nas ARPs, mas não para as proteínas estruturais do vírus VEE 3000.

[0076] Um alfavírus preferido para uso na presente invenção é o

vírus da encefalite eqüina Venezuelana (VEE). Preferencialmente, a cepa de VEE utilizada na produção das ARPs contém pelo menos uma mutação atenuadora. Uma classe representativa de tais mutações atenuadoras foi primeiramente denominada como mutantes "de penetração rápida" (Johnston e Smith, *Virology* 162: 437-443, 1988), muitas das quais mostraram mais tarde carregar mutações na glicoproteína E2 que resultava em uma carga líquida positiva (Davis e outros, *Virology* 183:20-31, 1991) e também conferia uma capacidade maior de se ligar aos glicosaminoglicanos, por exemplo, o sulfato de heparana (ver também Klimstra, WB e outros 1998 72: 7357-7366; Bernard e outros, *Virology* 276: 93-103, 2000). Mutações similares são conhecidas em outros alfavírus, por exemplo, Sindbis (Olmsted e outros, *Virology* 148:245, 1986; Davis e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6771, 1986); um mutante de VEE atenuado que se liga à heparina especificamente exemplificado é a cepa 3014. Os vírus ou as ARPs derivadas dos mesmos, que carregam mutações que conferem a capacidade de ligação ao glicosaminoglicano são particularmente adequados para a purificação utilizando a etapa de lavagem com sal e podem também ser adicionalmente purificadas utilizando a cromatografia por afinidade à heparina.

[0077] As células auxiliaadoras, no contexto desta invenção, são células que, quando os ácidos nucléicos auxiliaadores e de replicon estão presentes nas mesmas, produzem partículas de replicon. As células em que as funções auxiliaadoras são codificadas em uma ou mais seqüências integradas de forma estável, também podem ser utilizadas para empacotar as ARPs. O DNA ou o RNA pode ser introduzido através de qualquer meio conhecido na técnica que seja apropriado para o tipo de célula particular, incluindo sem limitação, a transformação, a lipofecção ou a eletroporação. Alternativamente, as células transformadas de forma estável nas quais os genes estruturais necessários

para o empacotamento do ácido nucléico do replicon nas partículas virais são integrados dentro do genoma também podem ser utilizadas para preparar as ARPs utilizando os métodos descritos aqui.

[0078] É reconhecido pelos peritos na técnica que as seqüências codificadoras podem variar por causa da degeneração do código genético e do uso de códons. Todas as seqüências sinônimas que codificam o antígeno ou outro polipeptídeo ou proteína de interesse estão incluídas dentro do âmbito desta invenção.

[0079] Adicionalmente, é reconhecido pelos peritos na técnica que podem ocorrer variações alélicas nas seqüências codificadoras que não alteram significativamente a atividade das seqüências de aminoácidos dos peptídeos que tais seqüências codificam. Todos as tais seqüências de DNA equivalentes estão incluídas dentro do âmbito desta invenção e na definição de um promotor.

[0080] As técnicas padrão para clonagem, isolamento, amplificação e purificação do DNA, para reações enzimáticas que envolvem a DNA ligase, a DNA polimerase, as endonucleases de restrição e similares e várias técnicas de separação são as conhecidas e comumente empregadas pelos peritos na técnica. Um número de técnicas padrão é descrito em Sambrook e outros (1989) *Molecular Cloning*, Segunda Edição, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, Nova York; Maniatis e outros (1982) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, Nova York; Wu (ed.) (1993) *Meth. Enzymol.* 218, Part I; Wu (ed.) (1979) *Meth. Enzymol.* 68; Wu e outros (eds.) (1983) *Meth. Enzymol.* 100 e 101; Grossman e Moldave (eds.) *Meth. Enzymol.* 65; Miller (ed.) (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nova York; Old e Primrose (1981) *Principles of Gene Manipulation*, University of California Press, Berkeley; Schleif e Wensink (1982) *Practical Methods in Molecular Biology*; Glover (ed.) (1985) *DNA Cloning* Vol. I e II, IRL Press, Oxford, UK;

Hames e Higgins (eds.) (1985) *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, UK; Setlow e Hollaender (1979) *Genetic Engineering: Principles e Methods*, Vols. 1-4, Plenum Press, Nova York; e Ausubel e outros (1992) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene/Wiley, Nova York, NY. As abreviações e a nomenclatura, quando empregadas, são consideradas padrão no campo e são comumente utilizadas nos periódicos profissionais tais como os citados aqui.

[0081] As formulações farmacêuticas, tais como as vacinas ou outras composições imunogênicas, da presente invenção compreendem uma quantidade imunogênica das partículas de replicon de alfavírus defeituosas em relação à propagação infecciosas ou partículas atenuadas vivas em combinação com um veículo farmaceuticamente aceitável. Uma "quantidade imunogênica" é uma quantidade das partículas de alfavírus infecciosas que é suficiente para ativar uma resposta imunológica no indivíduo ao qual a formulação farmacêutica é administrada. Acredita-se que uma quantidade de aproximadamente 10^4 até aproximadamente 10^9 , especialmente de 10^6 até 10^8 , unidades infecciosas ou ARPs por dose seja adequada, dependendo da idade e da espécie do indivíduo que está sendo tratado. Os exemplos de veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados à água esterilizada livre de agentes pirogênicos e à solução salina fisiológica esterilizada livre de agentes pirogênicos. Os indivíduos que podem receber a administração de quantidades imunogênicas das partículas de alfavírus defeituosas em relação à replicação infecciosas da presente invenção incluem indivíduos humanos e animais (por exemplo, o cão, o gato, o gado, o cavalo, o burro, o camundongo, o hamster, os macacos, os porquinhos-da-Índia, as aves, os ovos). A administração pode ser através de qualquer meio adequado, tal como a administração intraperitoneal, intramuscular, intradermal, intranasal, intravaginal, intra-rectal, subcutânea ou intravenosa.

[0082] Uma ou mais moléculas potenciadoras do sistema imunológico, tais como as quimiocinas e/ou as citocinas podem ser incorporadas nas composições imunogênicas que compreendem as partículas de replicon do alfavírus preparadas como descrito aqui. Alternativamente, as composições imunogênicas podem compreender partículas de replicon de alfavírus que direcionam a expressão ou uma ou mais quimiocinas e/ou citocinas no paciente ou no animal ao qual a composição é administrada. Os exemplos de quimiocinas e/ou citocinas incluem, sem limitação, a interleucina-4, interleucina-12, o gama-interferon, o fator estimulador de colônias de macrófagos granulócitos e o ligante FLT-3. É entendido que a escolha da citocina e/ou quimiocina pode variar de acordo com a neoplasia, o parasita ou o agente patogênico que é direcionado para uma resposta imunológica.

[0083] As composições imunogênicas que compreendem as ARPs (que direcionam a expressão da(s) seqüência(s) de interesse quando as composições são administradas a um ser humano ou um animal) produzidas utilizando os métodos da presente invenção podem ser formuladas através de qualquer um dos meios conhecidos na técnica. Tais composições, especialmente as vacinas, são tipicamente preparadas na forma de injetáveis, na forma de soluções ou de suspensões líquidas. As formas sólidas adequadas para a solução em ou para a suspensão em líquido antes da injeção também podem ser preparadas. As preparações liofilizadas também são adequadas.

[0084] Os ingredientes imunogênicos ativos (as ARPs) são frequentemente misturados com excipientes ou veículos que são farmacologicamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente ativo. Os excipientes adequados incluem, mas não estão limitados à água esterilizada, à solução salina, à dextrose, ao glicerol, ao etanol ou similares e a combinações dos mesmos, assim como estabilizantes, por exemplo, HSA ou outras proteínas e açúcares redutores adequados.

[0085] Em adição, se desejado, as vacinas podem conter quantidades menores de substâncias auxiliares tais como agentes umectantes ou emulsificantes, agentes tamponadores do pH e/ou adjuvantes que aumentam a eficiência da vacina. Os exemplos de adjuvantes que podem ser eficientes incluem, mas não estão limitados: ao hidróxido de alumínio; à N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP); à N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, referida como nor-MDP); à N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilóxi)-etilamina (CGP 19835A, referida como MTP-PE); e a RIBI, que contém três componentes extraídos de bactérias, monofosforil lipídeo A, dimicolato de trealose e esqueleto da parede celular (MPL + TDM + CWS) em uma emulsão de 2% escaleno/Tween 80. A eficiência de um adjuvante pode ser determinada através da medida da quantidade de anticorpos direcionados contra o produto imunogênico da ARP resultante da administração do imunógeno nas vacinas que são também compreendidas dos vários adjuvantes. Tais formulações adicionais e modos de administração que são conhecidos na técnica também podem ser utilizados.

[0086] As composições que contêm ARPs imunogênicas (ou biologicamente ativas de outra forma) são administradas de uma forma compatível com a formulação da dosagem e em tal quantidade que será profilaticamente e/ou terapeuticamente eficientes. A quantidade que será administrada, que fica geralmente na faixa de aproximadamente 10^4 até aproximadamente 10^9 unidades infecciosas por mL em uma dose, depende do indivíduo que será tratado, da rota através da qual as ARPs são administradas, da imunogenicidade do produto de expressão, dos tipos de respostas imunológicas efetoras desejadas e do grau de proteção desejado. As quantidades precisas do ingrediente ativo necessárias para serem administradas podem depender do julgamento do médico, do veterinário ou de outro praticante da área da

saúde e pode ser peculiar a cada indivíduo, mas tal determinação está dentro da perícia de tal praticante.

[0087] A vacina ou outra composição imunogênica pode ser fornecida em um planejamento de dose única ou de várias doses. Um planejamento de várias doses é um em que um curso primário de vacinação pode incluir 1 até 10 ou mais doses separadas, seguidas por outras doses administradas em intervalos de tempo subsequentes que são necessários para manter e ou reforçar a resposta imunológica, por exemplo, semanalmente ou em 1 até 4 meses para uma segunda dose e se necessário, uma ou mais doses subsequentes após vários meses/anos.

[0088] Todas as referências citadas no presente pedido de patente são incorporadas aqui como referência até a extensão que não haja inconsistência o presente relatório descritivo.

[0089] Os exemplos a seguir são fornecidos com finalidades ilustrativas e não é pretendido que limitem o âmbito da invenção que é reivindicado aqui. É pretendido que quaisquer variações nos artigos e nos métodos exemplificados que ocorrem aos peritos na técnica se encaixem dentro do âmbito da presente invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Parâmetros do RNA que Afetam o Rendimento das ARPs

[0090] Uso de RNAs Auxiliadores sem Cap em Vários Tipos de Células

Células 293 T

[0091] As células 293T foram cultivadas em meio DMEM com 10% de FBS. A eletroporação foi realizada em uma cubeta com espaço de 0,4 cm com um eletroporador com ondas quadradas BTX (Modelo 830; Genetronics, Inc., São Diego, CA) utilizando $4,8 \times 10^7$ células em PBS e 30 µg de cada um dos três RNAs a seguir (purificados utilizando um RNeasy Midi Kit #75142, Qiagen Corp., Valencia, CA): auxiliador de

capsídeo do VEE, auxiliador da glicoproteína do VEE e replicon com GFP do VEE. Os RNAs auxiliares foram preparados através da transcrição *in vitro* com ("cap") ou sem ("sem cap") a adição do nucleotídeo G com cap na reação de transcrição. Nas reações que incluíam o análogo do cap, a concentração do rGTP foi proporcionalmente reduzida. Quatro pulsos a 360 V com um comprimento de pulso de 450 μ sec foram utilizados. Após a eletroporação, as células foram semeadas em frascos T-75 contendo 25 mL de meio. As ARPs foram coletadas do meio e tituladas em células Vero.

Células CHO

[0092] As células CHO foram crescidas em meio F-12 com 10% de FBS. A eletroporação foi realizada em um eletroporador em onda quadrada BTX utilizando $1,2 \times 10^7$ células em PBS e 30 μ g de cada um dos três RNAs a seguir: auxiliador do capsídeo do VEE, Auxiliador da glicoproteína do VEE e replicon com GFP do VEE. Foram utilizados quatro pulsos a 580 V com um comprimento de pulso de 450 μ sec. Após a eletroporação, as células foram semeadas em frascos T-75 contendo 25 mL de meio. As ARPs foram coletadas do meio e tituladas em células Vero.

DF-1 (frango)

[0093] As células DF-1 foram cultivadas em meio DMEM com 10% de FBS. As condições eram como as descritas para as células CHO.

Vero

[0094] As células Vero foram cultivadas em meio EMEM com 10% de FBS. As condições eram como as descritas para as células CHO.

[0095] Os resultados são apresentados na Figura 1, mostrando a IFU/mL obtida com a utilização de RNAs auxiliares sem cap vs. com cap nos tipos de células indicados.

[0096] Efeito da Purificação do RNA e da Adição de Cap sobre o Rendimento das ARPs

[0097] Em um experimento empregando um RNA de vetor de replicon que codifica gag do HIV e dois RNAs auxiliares codificando os genes do capsídeo e das glicoproteínas do VEE, foram realizadas reações de transcrição *in vitro* utilizando um kit disponível comercialmente da Promega Corporation (Madison, WI; Cat No. P1300). Para preparar os RNAs auxiliares e de replicon com cap, o G com cap foi adicionado à reação de transcrição e a concentração de rGTP foi reduzida em 1,4 mM quando comparada a dos outros rNTPs. Para preparar o RNA auxiliar sem cap, os quatro rNTPs foram utilizados em concentrações equimolares. A purificação do RNA foi realizada utilizando o Promega SV total RNA Isolation System (Promega Corp., Madison, WI; Nº de Catálogo Z3100, uma resina de sílica) e eluindo o RNA em água sem RNase. Outros métodos de purificação do RNA também são adequados, tal como a cromatografia por exclusão de tamanho, mas um parâmetro importante é o uso de um método que gera uma solução de RNA concentrado muito puro, isto é, pelo menos 0,5 µg/µL, preferencialmente de pelo menos 2 - 3 µg/µL. As concentrações dos RNAs purificados foram determinadas utilizando um espectrofotômetro, enquanto que a concentração dos RNAs não-purificados (obtidos através da utilização da reação de transcrição diretamente) foi estimada correndo uma alíquota de 1 µL em um gel de formaldeído com alíquotas de quantidades de RNA conhecidas.

[0098] Quantidades equivalentes de cada um dos RNAs auxiliares, 5 ou 30 µg, com cap ou sem cap, foram submetidas à eletroporação em $1,2 \times 10^7$ de células VERO em um volume final de 800 µL utilizando uma cubeta para eletroporação com espaço de 0,4 cm (4 pulsos a 580V, 25 µF), junto com 30 µg do RNA do vetor do replicon codificando gag do HIV. Após a eletroporação, as células foram semeadas em um frasco T75 com 25 mL de HyQMEM + 10% de FBS e incubadas durante a noite a 37°C e 5% de CO₂. As ARPs foram coletadas em

24 horas, filtradas e tituladas em células VERO. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros do RNA

Quantidade de RNA	RNA Purificado?	RNA com Cap?	Rendimento de ARP
5 µg	Não	Sim	$3,84 \times 10^3$
5 µg	Não	Não	$4,27 \times 10^2$
5 µg	Sim	Sim	$2,77 \times 10^5$
5 µg	Sim	Não	$4,27 \times 10^3$
30 µg	Não	Sim	$2,56 \times 10^4$
30 µg	Não	Não	$1,07 \times 10^3$
30 µg	Sim	Sim	$2,13 \times 10^6$
30 µg	Sim	Não	$2,56 \times 10^6$

[0099] A purificação do RNA (tanto dos auxiliadores quanto do RNA de replicon de vetor) antes da eletroporação nas células aumenta drasticamente o rendimento das ARPs (comparar as Fileiras 1&2 com 3&4 e as Fileiras 5&6 com 7&8). Além disso, com o uso do RNA purificado, a adição de cap dos RNAs auxiliadores não é necessária em concentrações maiores de RNA (comparar a Fileira 1 com a Fileira 2, 3 com a 4, 5 com a 6 e 7 com a 8).

[00100] Resultados similares foram obtidos utilizando RNA(s) auxiliador(es) sem cap com um vetor de replicon de alfavírus em que foi inserida uma sequência que codifica PSMA (antígeno do câncer de próstata).

Exemplo 2. Parâmetros Importantes na Purificação do RNA

[00101] Os RNAs do replicon e auxiliadores foram preparados como descrito no Exemplo 1. Para a eletroporação, 30 µg de cada RNA de replicon e auxiliador foram combinados em tubos para microcentrifuga livre de Rnase. Os tubos de controle possuíam RNAs purificados ou não purificados isoladamente, enquanto que o restante dos tubos re-

cebeu adicionalmente o tampão de reação de transcrição 5X [400 mM de HEPES-KOH (pH 7,5); 120 mM de $MgCl_2$; 10mM de espermidina; 200mM de DTT), a enzima de restrição Not I, a mistura de enzima de T7 (RNA polimerase dependente do RNA do T7, inibidor da Rnase, pirofosfatase) ou combinações destes três. As concentrações finais de cada componente de reação de transcrição eram aproximadamente equivalentes àquelas em um volume equivalente do RNA não-purificado. $1,2 \times 10^7$ de células VERO foram adicionadas a cada tubo de microcentrífuga e a mistura foi transferida para um cubeta para eletroporação com espaço de 0,4 cm. As células foram submetidas a pulsos 4 vezes a 580 V e 25 μF e foi permitido que se recuperassem à temperatura ambiente durante 10 min. As células eletroporadas foram semeadas em frascos T75 contendo 25 mL de HyQMEM com 10% de soro fetal bovino e antibióticos. Foram semeadas alíquotas em placas de 96 cavidades para a análise das eficiências de eletroporação.

[00102] As células VERO em placas de 96 cavidades foram fixadas com MeOH e analisadas em relação à expressão do replicon ou da proteína auxiliadora através do ensaio de imunofluorescência (IFA). As eficiências dos RNAs purificados eram maiores que 90% para todos os três RNAs, enquanto as eficiências dos controles de RNAs não-purificados eram de 50% ou inferiores. A adição de Not I ou da mistura de enzimas do T7 isoladamente aos RNAs purificados possuía pouco até nenhum efeito sobre as eficiências de eletroporação. A adição do tampão de transcrição isoladamente ou em combinação com outros componentes da reação de transcrição diminuía as eficiências de eletroporação até 10% ou inferiores.

[00103] O meio de cultura foi coletado de frascos T7 e filtrado para remover os restos celulares. O rendimento das ARPs partindo de cada eletroporação foi determinado através da titulação em células Vero em placas de 96 cavidades. Como mostrado na Tabela 2, os rendimentos

das ARPs utilizando RNAs não-purificados diminuíram em dois logs quando comparados aos rendimentos utilizando RNAs purificados. A Not I ou a mistura de enzima do T7 não possuía efeito significativo sobre os rendimentos das ARPs quando adicionada aos RNAs purificados isoladamente; entretanto, a adição do tampão de reação de transcrição do T7 em qualquer combinação resultou em um decréscimo de 4 logs ou maior nos rendimentos das ARPs quando comparados com os dos RNAs purificados.

[00104] Estes resultados sugerem que um ou mais componentes do tampão de reação de transcrição podem ter um efeito negativo sobre as eficiências de eletroporação e em última análise sobre o rendimento das ARPs. O decréscimo significativo nos rendimentos das ARPs quando o tampão de transcrição do T7 é adicionado ao RNA purificado quando comparados com os para o RNAs não-purificados contendo o tampão de transcrição do T7 sugere que o efeito é quantitativo, uma vez que a concentração dos componentes do tampão era maior na amostra de RNAs purificados.

Tabela 2. Efeito da Manipulação do RNA sobre o Rendimento das ARPs

RNA	Componente de Transcrição <i>In Vitro</i>	Rendimento de ARP
Purificado	Nenhum	$1,4 \times 10^7$
Não-purificado	Nenhum	$1,1 \times 10^5$
Purificado	Tampão 1X	lod*
Purificado	Enzima Not I	$1,9 \times 10^7$
Purificado	Mistura de enzima do T7	$3,2 \times 10^6$
Purificado	Tampão 1X + Enzima Not I	lod
Purificado	Tampão 1X + Mistura de enzima do T7	lod
Purificado	Enzima Not I + Mistura de enzima do T7	$1,4 \times 10^7$
Purificado	Tampão 1X, Not I, Mistura de enzima do T7	lod

*lod = no ou abaixo do limite de detecção (aproximadamente $2,1 \times 10^3$ ARP/mL)

Exemplo 3. Efeito das Condições de Eletroporação sobre o Rendimen- to das ARPs

[00105] Nos experimentos iniciais com a eletroporação de certas de célula linhagens para eletroporação, por exemplo, com as células 293T e CEF, foi observado que rendimentos maiores das ARPs poderiam ser obtidos através do aumento da concentração das células na mistura para eletroporação, enquanto se mantinha a mesma quantidade de ácidos nucléicos de entrada.

Experimento 1

[00106] As células Vero foram ressuspensas na concentração indicada em PBS em uma cubeta com espaço de 0,4 cm, com 30 µg de RNA do replicon (codificando um antígeno de tumor cancerígeno), 26,8 µg de auxiliador de RNA do capsídeo do VEE e 55,6 µg do auxiliador de RNA da glicoproteína do VEE. Após a eletroporação, as células foram semeadas em um ou mais frascos, quando necessário, a uma densidade de $1,4 \times 10^5$ células/cm² de área de crescimento com aproximadamente 0,3 mL de meio de cultura por cm². Vinte e três horas após a eletroporação, o meio foi coletado de cada frasco e as monocamadas de células foram lavadas com aproximadamente 10 mL de meio livre de soro. Esta solução de lavagem foi adicionada ao meio coletado de cada frasco. Uma lavagem com sal foi então realizada em cada frasco, utilizando 0,5 M de NaCl durante 10 minutos. A lavagem com sal foi coletada e analisada separadamente. Quando indicado, uma segunda lavagem com sal foi realizada e analisada separadamente. Os rendimentos das ARPs são apresentados na Tabela 3 na forma do número total de partículas obtidas partindo da eletroporação em uma única cubeta.

Tabela 3. Parâmetros de Lavagem e Rendimento das ARPs

Concentração de Células Células/ mL; unidade relativa	Volume de meio ou de lavagem com sal	Rendimento das ARPs	Rendimento total das ARPs (lavagem com sal + meio)
3 x 10 ⁷ 2X	50 mL de meio	9,0 x 10 ⁷	
	10 mL de lavagem com sal	6,9 x 10 ⁸	7,8 x 10 ⁸
9 x 10 ⁷ 6X	150 mL de meio	6,2 x 10 ⁸	
	30 mL de lavagem com sal #1	1,1 x 10 ⁹	
	30 mL de lavagem com sal #2	4,5 x 10 ⁸	2,2 x 10 ⁹
1,2 x 10 ⁸ 8X	225 mL de meio	3,2 x 10 ⁸	
	30 mL de lavagem com sal #1	2,4 x 10 ⁹	
	30 mL de lavagem com sal #2	1,2 x 10 ⁹	3,9 x 10 ⁹
1,5 x 10 ⁸ 10X	300 mL de meio	4,8 x 10 ⁸	
	60 mL de lavagem com sal #1	3,8 x 10 ⁹	
	60 mL de lavagem com sal #2	1,4 x 10 ⁹	5,7 x 10 ⁹

[00107] Assim, um aumento de cinco vezes na concentração de células, sem qualquer aumento na quantidade de RNA utilizado na eletroporação, resulta em um aumento de quase 10 vezes no rendimento das ARPs.

Empacotamento das ARPs com um Único Auxiliador de DNA

[00108] As células Vero foram ressuspensas em meio sem soro nas densidades celulares indicadas. As células foram submetidas à eletroporação utilizando 30 µg de um RNA de replicon do VEE do gag do HIV e 100 - 150 µg de auxiliador de DNA do VEE expressando todas as proteínas estruturais do VEE sob um promotor do CMV. O auxiliador de DNA foi purificado e concentrado a pelo menos 5 mg/mL antes do uso na eletroporação.

[00109] Após a eletroporação, as células foram incubadas durante 10 minutos à temperatura ambiente e então foram transferidas para 4

mL de OptiPro, que foi então dividido igualmente em dois frascos T300 cada um contendo 100 mL de OptiPro. As células foram incubadas durante a noite a 37°C e 5% de CO₂. As ARPs foram coletadas retirando primeiro das células o meio por aspiração e passando-o através de um filtro de 0,2 micron para um recipiente esterilizado. As células no frasco foram lavadas durante 5 minutos à temperatura ambiente com 10 mL de uma solução de NaCl a 1 M em 20 mM de NaPi, pH 7,2 - 7,4. A lavagem com sal foi transferida para o filtro utilizado e incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Esta lavagem com sal foi passada através do filtro para um recipiente limpo e separado do meio. O meio e a lavagem com sal foram mantidos e titulados separadamente. A UFI total, que é relatada na Tabela 4, representa a soma da lavagem com sal e o meio; geralmente, o meio continha um número insignificante de ARPs quando comparado com a lavagem com sal. Resultados similares foram obtidos utilizando uma solução de lavagem com sal de NaCl a 0,5 M.

Experimento 3.

[00110] Um Corning Cell Cube (Corning, Inc., Acton, MA) foi utilizado para cultivar uma quantidade grande de células. Uma única eletroporação foi realizada utilizando 5×10^8 células Vero em uma cubeta para eletroporação com espaço de 1 cm. 150 µg de cada um de replicon do VEE (codificando gag do HIV), auxiliador do capsídeo do VEE e auxiliador da glicoproteína do VEE foram submetidos à eletroporação nas células utilizando 4 pulsos a 1150V, 25 uF em um eletroporador da Bio-Rad (Gene Pulser II, BioRad Laboratories, Inc., Hercules, CA; Nº de Catálogo 165-2105). Após a eletroporação, as células foram semeadas em 5 frascos T-300 contendo 100 mL de OptiPro SFM (Invitrogen, Carlsbad, CA; Nº de Catálogo 12309019). Vinte e quatro horas pós-eletroporação, o meio foi coletado de cada frasco e combinado para a titulação. Uma lavagem com sal foi então realizada em cada

frasco utilizando 20 mL de NaCl a 1,0 M em cada frasco e as lavagens com sal foram combinadas para a titulação. O rendimento total das ARPs no meio era de 1×10^8 i.u.; o rendimento total das ARPs na lavagem com sal era de $2,2 \times 10^{11}$ i.u.

Exemplo 4. Parâmetros de Cultura Pós-Eletroporação

Meio de Crescimento Pós-Eletroporação

[00111] Nos relatos anteriores da produção das ARPs, as células são semeadas no meio contendo 10% de FBS pós-eletroporação. Para verificar os efeitos do soro sobre o rendimento das ARPs, as células foram semeadas em meios diferentes com concentrações variáveis de soro. Um meio pós-eletroporação ótimo não requereria o uso de soro e teria uma baixa concentração de proteínas. Os meios com teores menores de soro assim como três meios livres de soro foram examinados para uso em eletroporações com altas densidades de células: meio OptiPro livre de soro, Gibco Cell Culture/Invitrogen, São Diego, CA; VP-SFM, VP Serum Free Medium, Gibco Cell Culture/Invitrogen, São Diego, CA; Ex-Cell 505, JRH Biosciences, Lenexa, KS; e meio de cultura de células definido quimicamente InVitrus, (Cell Culture Technologies GmbH, Zurich, CH; Nº de Catálogo IVT). Todos estes meios possuem um pH tamponado entre 7,0 e 7,4. As células Vero foram submetidas à eletroporação com RNAs auxiladores e de replicon. A mistura para eletroporação foi dividida entre 8 frascos T-75 contendo os meios diferentes. As células foram cultivadas durante 18 - 24 horas a 37°C. A análise dos rendimentos das ARPs revelou que os níveis de soro no EMEM podem ser reduzidos de 10% para 1% sem decréscimo significativo nos rendimentos das ARPs. Ainda, o meio OptiPro forneceu rendimentos das ARPs equivalentes aqueles em EMEM + 10% de FBS. O OptiPro, que é isento de proteínas humanas e/ou de animais, forneceu rendimentos das ARPs equivalentes aos obtidos utilizando EMEM + 10% FBS para várias ARPs diferentes. Os meios livres de

soro úteis para o crescimento de pós-eletroporação e para a produção das ARPs incluem vários meios disponíveis comercialmente:

[00112] O Efeito do pH do Meio de Crescimento Pós-Eletroporação

[00113] O efeito do pH do meio de crescimento pós-eletroporação sobre o rendimento das ARPs também foi verificado. As células Vero foram submetidas à eletroporação em um aparelho de eletrodo para placa de Petri e foram inoculadas alíquotas no meio de crescimento completo ajustado do pH de interesse. Os resultados são mostrados na Figure 4.

Cartuchos de Fibra Côncava para o Crescimento de Células Pós-Eletroporação

[00114] Foi descoberto que as células eletroporadas se aderem rapidamente a fibras de polissulfona, tais como aquelas no FiberCell HF Cartridge (Fibercell Systems, Inc.; Frederick, MO; Nº de Catálogo: 4300-C2011). A colocação das células eletroporadas em uma fibra côncava fornece vantagens para a coleta das ARPs produzidas pelas células nas fibras côncavas. O volume final em que as ARPs podem ser eluídas pode ser tão baixo quanto 40 mL (utilizando um cartucho pequeno que pode sustentar até 10^9 células) até 100 mL (cartucho maior que pode sustentar até 5×10^{10} células).

Tabela 4. Densidade Celular e Rendimento das ARPs

Densidade de Células Vero Na Cubeta de Eletroporação (células/mL)	Rendimento das ARPs (IFU Total)
$2,5 \times 10^7$	$6,5 \times 10^8$
$5,0 \times 10^7$	$9,5 \times 10^8$
$7,5 \times 10^7$	$3,6 \times 10^9$
$1,0 \times 10^8$	$3,45 \times 10^9$
$1,3 \times 10^9$	$6,4 \times 10^9$

Exemplo 5. Efeito da Concentração do RNA Auxiliador sobre os Rendimentos das ARPs

[00115] A eletroporação em uma cubeta com espaço de 0,4 cm foi

realizada utilizando 1×10^8 de células Vero. Cada eletroporação incluía 30 µg de cada do RNA do replicon de gag do HIV do VEE e do auxiliador da glicoproteína do VEE; a concentração do auxiliador do capsídeo do VEE era variada, como indicado. A eletroporação foi realizada em um instrumento da Bio-Rad utilizando as condições a seguir: 4 pulsos a 580V, 25 µF (comprimento resultante do pulso: aprox. 0,8 ms). As células foram semeadas em 50 mL de EMEM + FBS ou OptiPro, como indicado, em frascos T175. Vinte e quatro horas após a eletroporação, o meio de cada frasco foi coletado e filtrado. Cinco mL de NaCl a 1 M foram adicionados em cada frasco e foi permitido que incubassem com as células aderidas durante 5 minutos. A solução de lavagem com sal foi então removida e filtrada através do mesmo filtro utilizado para o meio coletado anteriormente.

Tabela 5. Concentração de RNA, Meio e Rendimento das ARPs

	Meio	Lavagem com Sal
30µg de RNA do capsídeo /EMEM + FBS	$2,20 \times 10^9$	$9,70 \times 10^{10}$
30µg de RNA do capsídeo /Optipro	$2,12 \times 10^9$	$9,10 \times 10^{10}$
90µg de RNA do capsídeo /Optipro	$3,12 \times 10^9$	$7,70 \times 10^{10}$
80µg de RNA do capsídeo /Optipro	$4,80 \times 10^8$	$8,00 \times 10^{10}$
30µg de RNA truncado do capsídeo /Optipro	$1,50 \times 10^9$	$9,00 \times 10^{10}$
90µg de RNA truncado do capsídeo /Optipro	$2,36 \times 10^9$	$8,30 \times 10^{10}$

Exemplo 6. Auxiliador de DNA e Condições de Eletroporação

[00116] Tipicamente, quantidades maiores de DNA e condições de eletroporação de alguma forma diferente são necessárias para a obtenção da eletroporação eficiente dos auxiliadores de DNA nas células Vero, quando comparadas às quantidades e às condições utilizadas para os auxiliadores de RNA. Por exemplo, os auxiliadores de DNA são submetidos à eletroporação utilizando 250 V, 950 µF ou 2 - 3 pulsos (30 ms) a 250 V, 800 µF, enquanto que os auxiliadores de RNA são submetidos à eletroporação utilizando 580 V, 25 µF (quatro pulsos).

[00117] Como com o RNA, o auxiliador (ou auxiliadores) de DNA é desejavelmente purificado(s) antes da eletroporação. Em uma cubeta para eletroporação com espaço de 0,4 cm, com 1×10^8 células Vero e um único auxiliador de DNA que codifica todas as proteínas estruturais do VEE, a eletroporação foi realizada utilizando dois dispositivos de eletroporação diferentes. A primeira máquina fornece um pulso de voltagem inicial que decai exponencialmente. Utilizando 100 ou 150 μg de DNA (de uma solução purificada a uma concentração de pelo menos 5 mg/mL), um ajuste útil de condições é um único pulso a 250V, 950 μF , que distribui um pulso de aproximadamente 20 até 30 milissegundos. A capacitância pode ser reduzida, por exemplo, até 800 μF e 2 - 3 pulsos a 250V fornecem aproximadamente o mesmo rendimento das ARPs. Em uma segunda máquina que distribui a voltagem na forma de uma onda quadrada, um pulso entre 20 e 50 ms a 300V forneceu resultados similares aos da primeira máquina. Este procedimento pode ser otimizado para todos os tipos de células variando o comprimento, a forma, a voltagem, a capacitância e o número de pulsos. As células Vero tipicamente não sobrevivem a um pulso de 25 ms acima de 400V. Uma vez que estas condições são adstringentes que as necessárias para fornecer o RNA do replicon do vetor, as partículas preparadas utilizando um auxiliador de DNA são submetidas à eletroporação nas condições otimizadas para o DNA e o RNA do replicon do vetor entra nas células eficientemente nestas condições.

[00118] 10^8 células em 0,8 mL foram submetidas à eletroporação utilizando 30 μg de um RNA de replicon de gag do HIV do VEE e 150 μg do auxiliador de DNA do VEE expressando todas as proteínas estruturais do VEE sob o controle de regulação de um promotor do CMV. Após a eletroporação, as células foram manipuladas e as ARPs foram coletadas e tituladas como descrito anteriormente na tabela abaixo.

Tabela 6. Condições de Eletroporação e Rendimento das ARPs

Voltagem (V)	Capacitância (μF)	# de Pulsos	IU Total
250	950	1	5,2e6
300	"	1	3,9e6
350	"	1	2,9e6
400	"	1	0
450	"	1	0
"	"	1	0
250	800	2	5,2e6
"	"	3	4,3e6
350	650	2	0
"	"	3	1,4e6
250	950	2	4,7e6

[00119] É observado que no experimento para o qual os dados são apresentados acima, acredita-se que a pureza insuficiente da preparação do auxiliador de DNA seja responsável pelos rendimentos gerais relativamente baixos, mas estes dados documentam os efeitos relativos dos parâmetros da eletroporação.

Exemplo 7. Sincronia de Células para a Produção das ARPs

[00120] Foi verificado o efeito da sincronia das células na fase G2/M do ciclo celular sobre a eficiência da eletroporação. As células foram tratadas 2 h após semeadura com 1 μ g/mL de afidicolina em DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) durante 20 h, foi permitido que ficassem em repouso durante 4 h e foram coletadas para a eletroporação (Golzio e outros (2002) Biochem. Biophys. Acta 1563:23-28). As eletroporações com o DNA auxiliador (junto com o RNA do replicon) foram realizadas como descrito aqui. As células foram observadas em relação ao crescimento e à morfologia celular ao longo de todo o método de tratamento. Com cada grupo de células, foi produzido um frasco contendo um controle para o tratamento com DMSO com os frascos tratados com afidicolina/DMSO. Não havia efeitos negativos sobre a saúde geral das células durante o tratamento nos frascos de teste ou

de controle. Foi determinado que era benéfica a obtenção da confluência dentro de um período de incubação de duas h antes de iniciar o protocolo de sincronia. A camada de células era melhor a 90 - 100% antes do início do tratamento com a afidicolina porque a divisão celular adicional era prevenida pelo tratamento. Utilizando células Vero, foi descoberto que uma densidade de $4,0 \times 10^5$ de células/cm² era muito alta; uma densidade de $1,1 \times 10^4$ de células/cm² resultou em uma confluência de 90% em 2 h.

Exemplo 8. Soluções de Pré-Lavagem e Rendimentos das ARPs

[00121] Após as ARPs terem sido produzidas pelas células submetidas à eletroporação, as células podem ser lavadas extensivamente com uma Solução de Lavagem de Células para remover materiais extrínsecos antes que a coleta das ARPs comece. A escolha da Solução de Lavagem de Células afeta o número das ARPs liberadas durante esta etapa de pré-lavagem.

[00122] Foi realizada uma única eletroporação em uma cubeta com espaço de 0,4 cm utilizando 1×10^8 de células Vero e 30 µg de cada um do RNA do replicon de gag do HIV do VEE, do RNA auxiliador do capsídeo do VEE e do RNA auxiliador da glicoproteína do VEE. As células foram semeadas igualmente em 8 frascos T-75, cada um contendo 25 mL de meio OptiPro. Após 24 horas, o meio foi removido, as monocamadas de células foram lavadas com 6 mL da solução de Lavagem de Células indicada e as células foram finalmente lavadas com 6 mL de NaCl a 1 M (tamponado com fosfato em pH 7,2). O meio, as soluções de Lavagem de Células e de lavagem com sal foram analisadas separadamente em relação ao rendimento das ARPs através da titulação em células Vero. Os resultados são apresentados na Figure 4

Exemplo 9. Parâmetros de Lavagem com Sal

Composição de Sais

[00123] A eletroporação foi realizada em um cubeta com espaço de

10 mm utilizando 5×10^8 de células vero, 150 μg de cada um do RNA do replicon de gag do HIV do VEE, do RNA auxiliador do capsídeo do VEE e do RNA auxiliador da glicoproteína do VEE. A eletroporação foi realizada utilizando 4 pulsos a 1150 V, 25 μF . As células eletroporadas foram semeadas igualmente entre 40 frascos T-75. Um frasco foi coletado em 16 horas, realimentado com meio fresco e coletado em 24 horas pós-eletroporação. Os outros frascos foram coletados em 24 horas. O meio foi removido de cada frasco e 5 mL da solução de sal indicada foram adicionados em cada frasco e incubados durante cinco minutos. A solução de lavagem com sal foi então removida e titulada. Os resultados obtidos utilizando estas soluções de lavagem diferentes são mostrados na Figura 5. A quantidade das ARPs (que é medida através da titulação) liberada no meio de cultura partindo das células é suavemente afetada pelo pH na faixa de pH 7,0 - 8,0 (ver a Figura 3).

Concentração de Sal no Meio de Liberação

Tabela 7. Parâmetros de Lavagem com Sal

Concentração de NaCl no Meio de Liberação	Ambiente (°C)	Rendimento das ARPs
5 M	4	$3,7 \times 10^8$
5 M	TA	$4,45 \times 10^8$
5 M	37	$3,5 \times 10^8$
2,5 M	4	$3,1 \times 10^8$
2,5 M	TA	$3,55 \times 10^8$
2,5 M	37	$4,60 \times 10^8$
1 M	4	$4,05 \times 10^8$
1 M	TA	$3,75 \times 10^8$
1 M	37	$4,35 \times 10^8$
0,5 M	4	$3,45 \times 10^8$
0,5 M	TA	$3,84 \times 10^8$

Exemplo 10. Purificação das ARPs

[00124] As ARPs podem ser purificadas através da cromatografia por afinidade utilizando várias resinas. Geralmente, pode ser utilizada uma faixa de condições de eluição, dependendo da resina escolhida, tomando-se cuidado de não submeter as ARPs a um pH menor que aproximadamente 6. É observado que o antígeno codificado pelo RNA do replicon é geralmente incorporado dentro das ARPs; as propriedades do antígeno podem afetar o comportamento das ARPs durante a purificação. O versado na técnica sabe como reconhecer tais efeitos e modificar o procedimento de purificação das ARPs conformemente.

Cromatografia de Afinidade pela Heparina

[00125] As ARPs em uma solução de lavagem com sal são diluídas com fosfato de sódio a 5 mM, pH 7,4, em um conteúdo de cloreto de sódio de 0,12 M ou inferior. A solução é então carregada em uma coluna contendo a resina Heparin Sepharose Fast Flow (Amersham, Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ; Nº de Catálogo 17-0998-01) ou a resina Heparin HyperD M (Biosepra, Marlboro, MA) a uma velocidade linear de 100 cm/h ou menor. Por exemplo, o eluato das ARPs do VEE 3014 a uma concentração de cloreto de sódio de aproximadamente 0,3 M em pH 7,4. As ARPs do VEE 3014 são coletadas e formuladas através da diluição direta ou através da diafiltração. Os rendimentos típicos para as ARPs purificadas através deste método são de 70%. Os gradientes de sal em etapas ou lineares podem ser utilizados para eluir as ARPs.

[00126] A maior parte dos contaminantes do soro e das células Vero é reduzida pela etapa de cromatografia em heparina; a maior parte de tais contaminantes não se liga à resina.

Cromatografia por Afinidade em Sulfato de Celufina

[00127] As ARPs em uma solução de lavagem com sal são diluídas com fosfato de sódio a 5 mM, pH 7,4, até um conteúdo de cloreto de

sódio de 0,25 M ou inferior. A solução é então carregada em uma coluna contendo um gradiente de resina de sulfato de celulose (Millipore) com teor de cloreto de sódio crescente. As ARPs são eluídas a uma concentração de cloreto de sódio de aproximadamente 0,7 M em um pH de 7,4. As ARPs são coletadas e formuladas através da diluição direta ou através da diafiltração. Os rendimentos típicos para as ARPs purificadas através deste método são de 85%.

Cromatografia por Interação Hidrofóbica

[00128] As ARPs em uma solução de lavagem com sal são diluídas com 5M de NaCl/20 mM de fosfato de sódio pH 7,4 em uma concentração final de NaCl de 3 M. As ARPs são carregadas em uma coluna que contém a resina Toyopearl fenila 650-M em uma velocidade linear de 100 cm/h e são eluídas com um gradiente linear de 3 M a 0 M de cloreto de sódio. A recuperação das ARPs através deste método é de aproximadamente 77%.

Cromatografia de Troca Aniônica

[00129] As ARPs são carregadas diretamente ou após a diluição adequada, em uma resina de troca aniônica, por exemplo, Toyopearl superQ ou Amersham Q Sepharose ou em membranas de troca aniônica, por exemplo, Mustang Q (Pall Trincor, Exton, PA). Os materiais da cromatografia Q se baseiam nas aminas quaternárias para a ligação de grupos ácidos nos materiais passados pelas mesmas. As condições de carregamento são manipuladas para possibilitar a ligação ou o fluxo contínuo de muitos tipos de ARPs, com as propriedades de ligação sendo influenciadas através da proteína expressa de interesse codificada pelo vetor de replicon de alfavírus e expressas nas células em que as ARPs são produzidas. Em certos casos, a resina de troca aniônica é suficiente para uma única etapa de purificação resultando na redução das proteínas do soro, das proteínas das células hospedeiras e do DNA. As propriedades de ligação das ARPs em uma certa

área da resina atuam na resina escolhida, nas espécies das ARPs e no pH e no conteúdo de sais da solução que carrega a preparação das ARPs.

[00130] Por exemplo, quando uma proteína do Marburg Musoke (uma glicoproteína) é o antígeno codificado de interesse e a proteína do revestimento das ARPs é a proteína de revestimento do VEE 3014, as ARPs são coletadas utilizando o procedimento de lavagem com sal. O material de lavagem com sal (preparação das ARPs) é carregado diretamente na membrana Mustang Q. As proteínas do material de lavagem com sal passam através da membrana e a membrana é lavada com 0,5 M de NaCl, 10 mM de fosfato de sódio para eluir qualquer DNA. As ARPs são então eluídas utilizando um gradiente em etapas, com a eluição a 1,5 M de NaCl, 10 mM de fosfato de sódio.

Exemplo 11. Efeito de Auxiliadores Diferentes de Capsídeo

[00131] As células AlphaVax WCB p146 foram ressuspensas em PBS até $1,6 \times 10^8$ célula/mL. Para as eletroporações 1 - 4, o RNA do replicon (com a seqüência codificadora de gD do Herpesvírus) recebeu a adição de cap G e foi purificado através da cromatografia por exclusão de tamanho. Os RNAs auxiliadores tiveram o cap retirado e foram purificados através da precipitação com LiCl para as eletroporações 1 - 3. Para a eletroporação 4, os RNAs auxiliadores tiveram o cap retirado e foram purificados através da cromatografia de exclusão de tamanho. 700 µL de células ($1,1 \times 10^8$ células) foram misturados com o RNA e submetidos à eletroporação em cubetas de 0,4 cm (eletroporador da BioRad, 580V, 25 µF, 4 pulsos). As células foram semeadas em dois frascos T300cm² com 100 mL de meio OptiPro em cada. As ARPs foram coletadas aproximadamente 18 horas pós-eletroporação em 30 mL 0,5 M de NaCl/10 mM de NaPO₄ e filtradas através de um filtro de 0,2 µm.

Tabela 8. Proporção de RNA e Parâmetros do Capsídeo.

Eletroporação	RNA auxiliador do capsídeo	Proporção de RNA (em µg) replicon:cap:gp	Título de ARP UI/mL
1	hcap4-3	30:30:60	1,1e9
2	hcap4 19nt	30:30:60	3,5e8
3	hcap4 121nt	30:30:60	5,1e8
4	hcap4-3	30:100:100	3,4e8

Tabela 8. -continuação-

Eletroporação	IU Total	IU por célula	Título do capsídeo IU/mL	Título de gp IU/
1	3,3e10	330	1,9e5	4,9e5
2	1,1e10	110	1,1e4	2,95
3	1,5e10	150	1,2e4	3,0e5
4	1,0e10	100	1,1e4	1,7e5

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a preparação de partículas de replicon de alfavírus (ARPs), caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) introduzir um vetor de replicon de RNA de alfavírus e uma ou mais moléculas de ácido nucléico auxiliaadoras em células permissivas para o alfavírus através da eletroporação, em que a concentração das células permissivas para o alfavírus no meio de cultura durante a eletroporação é de 5×10^7 a 5×10^8 células/mL; e em que a concentração do vetor de replicon de RNA de alfavírus adicionada às células antes da eletroporação é de 35 µg por mL;

(b) cultivar as células permissivas para o alfavírus contendo o vetor de replicon de alfavírus e um ou mais moléculas de ácido nucléico auxiliaadoras para formar os ARPs; e

(c) coletar os ARPs das células permissivas para o alfavírus cultivadas,

em que a uma ou mais moléculas auxiliaadoras é codificada dentro de uma molécula única de DNA auxiliadora que codifica todas as proteínas estruturais do alfavírus.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a eletroporação é realizada em uma câmara para eletroporação em que um espaço entre os eletrodos é entre 0,4 e 1,0 cm.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as células permissivas para o alfavírus após a etapa (b) são colocadas em contato com uma solução aquosa apresentando uma força iônica de 0,2 M a 5 M para liberar os ARPs para produzir uma solução contendo ARP; e os ARPs são coletados da solução contendo ARP.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração da molécula única de DNA auxiliadora

é de pelo menos 100 µg/mL.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as células permissivas para o alfavírus são células Vero.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o alfavírus é um alfavírus atenuado.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o alfavírus é o vírus da encefalite equina Venezuelana (VEE).

8. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa (c) é seguida por uma etapa de cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade pela heparina, de cromatografia por afinidade ou hidrofóbica.

Produção de VRPs utilizando auxiliadores de RNA com cap e sem cap

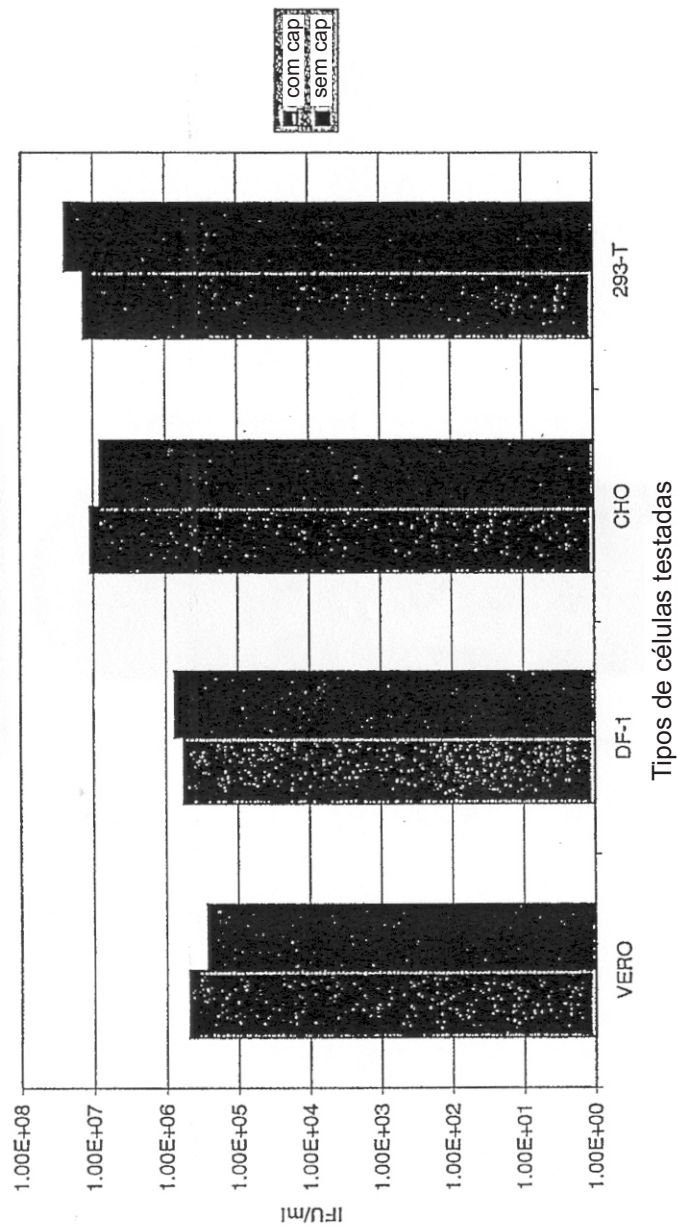


FIG. 1

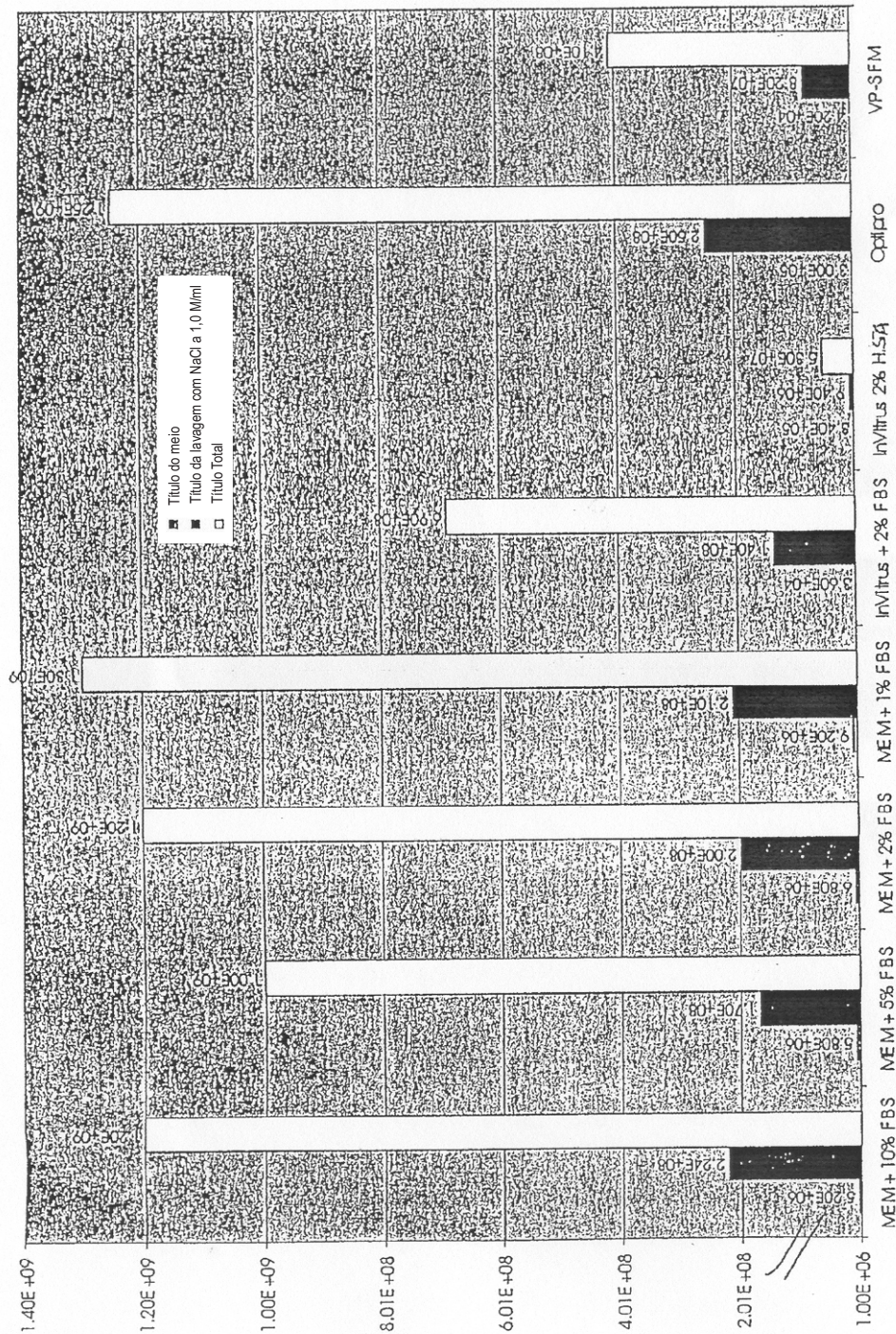
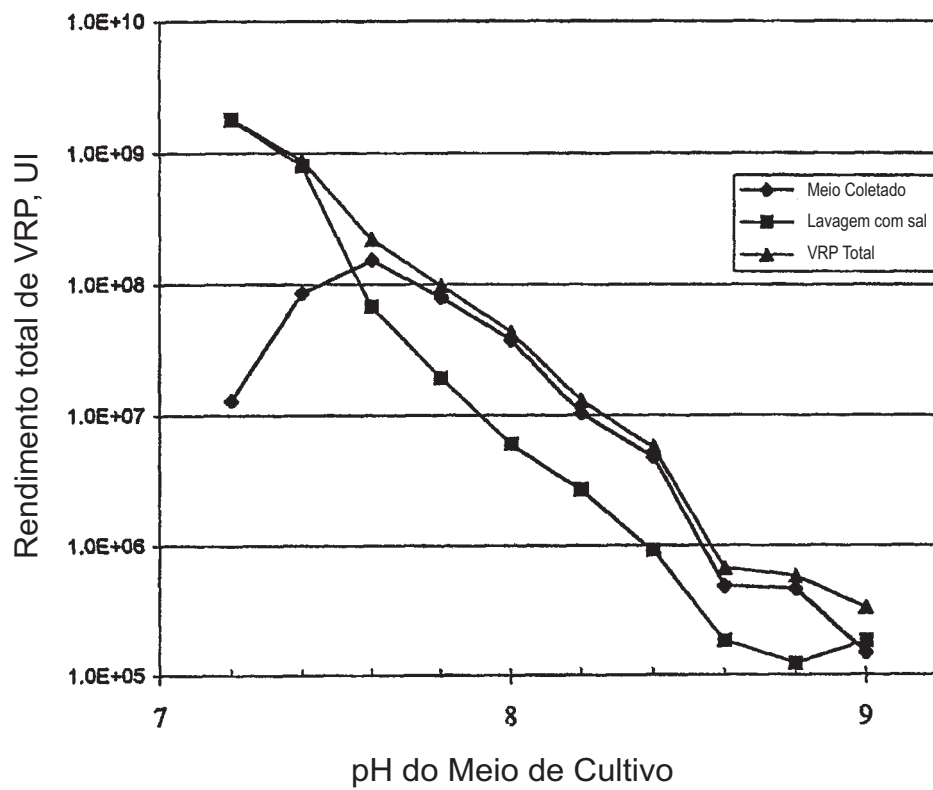


FIG. 2

**FIG. 3**

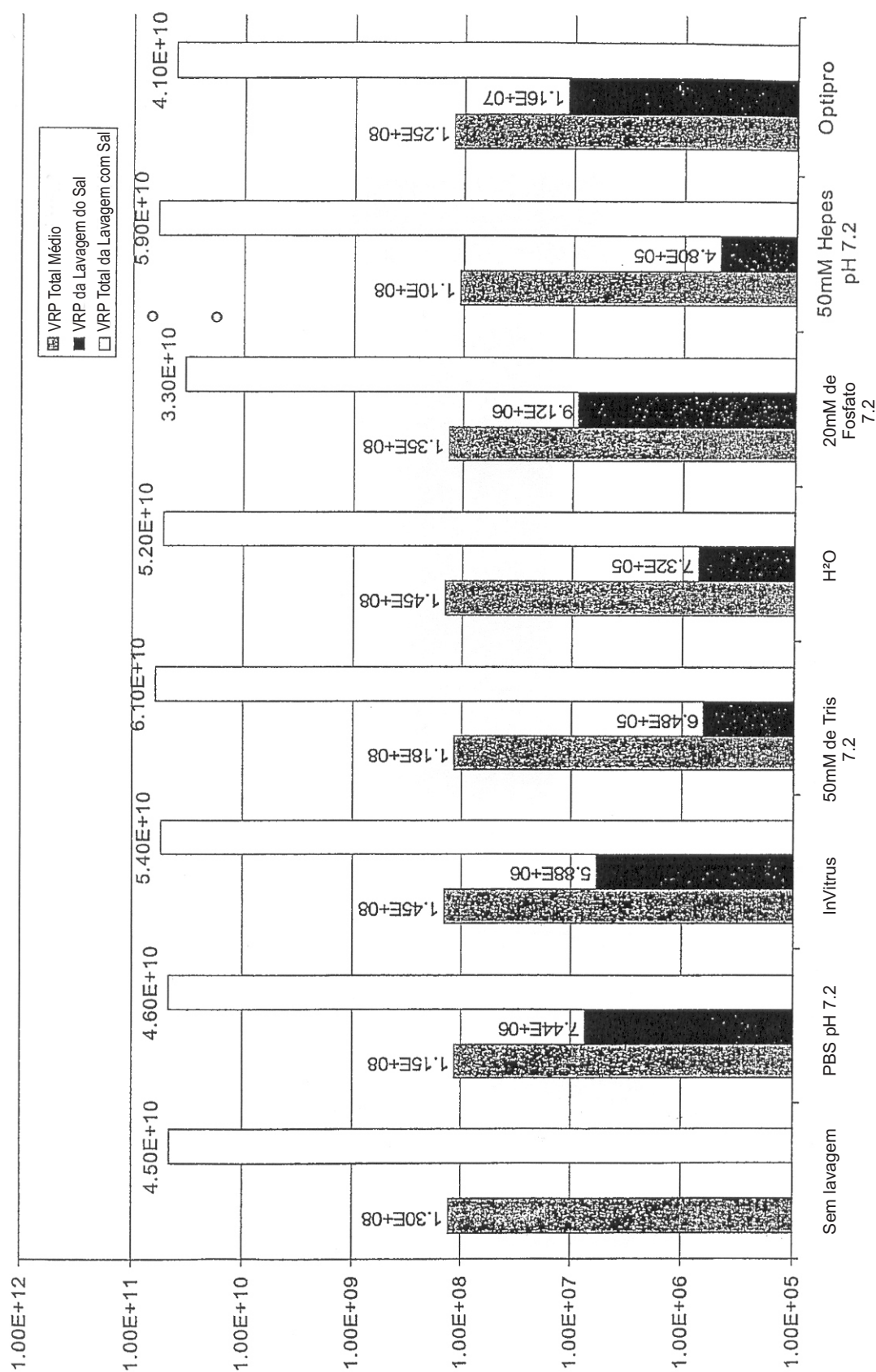
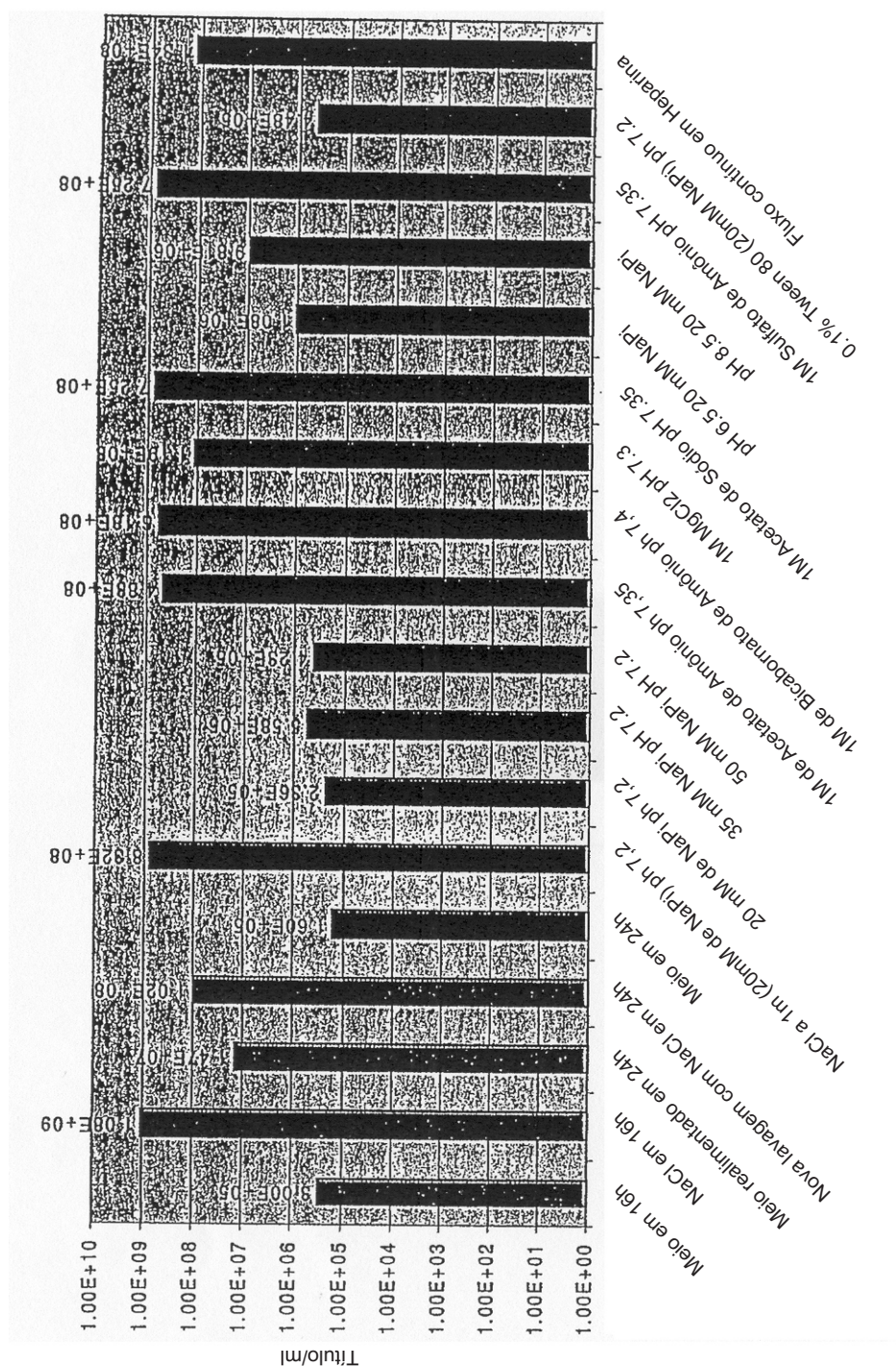


FIG. 4



Composições de Sais Diferentes para o Meio de Liberação

FIG. 5

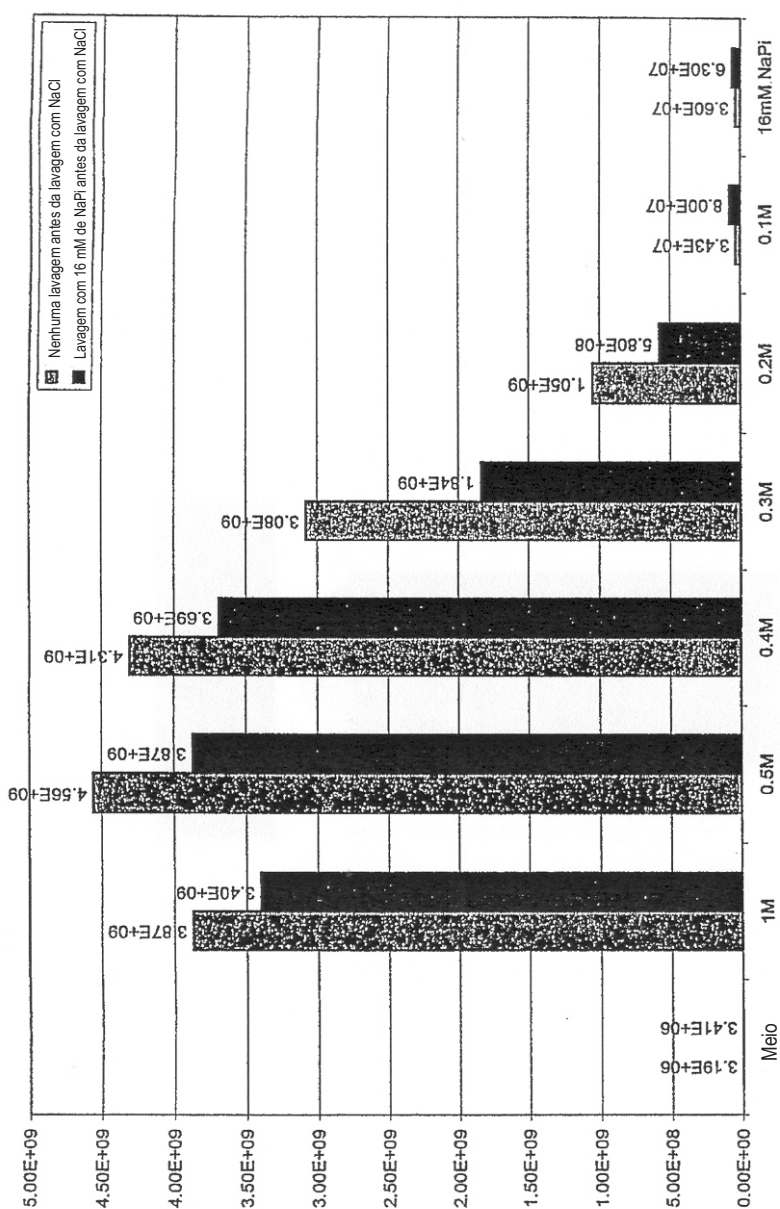


FIG. 6