



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

(21) BR 112019011661-3 A2



(22) Data do Depósito: 04/12/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 07/01/2020

(54) Título: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA AUMENTAR EXPRESSÃO DE GENE

(51) Int. Cl.: C12N 15/86.

(30) Prioridade Unionista: 05/12/2016 US 62/430,250; 17/04/2017 US 62/486,361; 17/11/2017 US 62/587,954.

(71) Depositante(es): SYNTHETIC GENOMICS, INC..

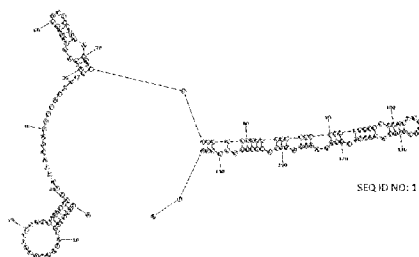
(72) Inventor(es): KURT IVER KAMRUD; MAUNG NYAN WIN; NATHANIEL STEPHEN WANG; JASON DEHART.

(86) Pedido PCT: PCT US2017064561 de 04/12/2017

(87) Publicação PCT: WO 2018/106615 de 14/06/2018

(85) Data da Fase Nacional: 04/06/2019

(57) Resumo: A presente revelação se refere em geral a moléculas de ácido nucleico para uso na regulação da expressão genética. O revelado neste documento inclui moléculas de ácido nucleico contendo um ou mais elementos estruturais do potenciador de capsídeo viral ligado de forma operacional a uma sequência de codificação de um gene de interesse. Em algumas realizações, o potenciador de capsídeo viral compreende um Loop A jusante (DLP) de uma proteína de capsídeo viral ou uma variante do DLP.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para:
"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA APERFEIÇOAR EXPRESSÃO DE GENE"

Pedidos Relacionados

[001] O presente pedido reivindica a prioridade do Pedido Provisório de nº de Série U.S. 62/430.250, depositado em 5 de dezembro de 2016; Pedido Provisório de nº de Série U.S. 62/486.361, depositado em 17 de abril de 2017 e Pedido Provisório de nº de Série U.S. 62/587.954, depositado em 17 de novembro de 2017. O conteúdo dos pedidos referenciados acima é incorporado expressamente pelo presente em sua totalidade a título de referência.

Incorporação da listagem de sequência

[002] O material na listagem de sequência anexa é incorporado aqui a título de referência neste pedido. O arquivo de texto de listagem de sequência anexo, de nome SGI012WO_SeqListing.txt, foi criado em 4 de dezembro de 2017, e tem 169 KB.

Campo

[003] A presente revelação refere-se ao campo de biologia molecular e engenharia genética, o que inclui moléculas de ácido nucleico úteis para regular expressão de gene, e o uso das moléculas de ácido nucleico para, por exemplo, produção de produtos desejados em células hospedeiras adequadas em cultura de células ou em um indivíduo, e para conferir características benéficas às

células ou indivíduos hospedeiros.

Antecedentes

[004] Avanços em biotecnologia e biologia molecular têm oferecido muitas oportunidades para desenvolver células e organismos recombinantes com características ou traços desejáveis comercialmente. Em particular, técnicas de engenharia genética modernas têm acelerado grandemente a introdução de genes e, conseqüentemente, novos traços em células e organismos recombinantes. Um nível de expressão apropriado de um gene desejável em, por exemplo, uma célula hospedeira ou um organismo transgênico é útil para alcançar essa meta.

[005] Entretanto, apesar da disponibilidade de muitas ferramentas moleculares, modificações genéticas de células hospedeiras e organismos são frequentemente restringidas por nível de expressão insuficiente ou expressão não controlada do gene de interesse. Assim, ainda há uma necessidade de elementos reguladores capazes de aprimorar expressão transgênica em células hospedeiras e organismos. A identificação de ferramentas moleculares inovadoras que inclui elementos reguladores, vetor de expressão, e sistemas de expressão que funcionam em vários tipos de organismos pode ser útil em desenvolver células e organismos aprimorados geneticamente.

Sumário

[006] Essa seção fornece um geral sumário do presente pedido, e não abrange seu escopo completo ou todos os seus recursos.

[007] A presente revelação se refere, em geral, a métodos e composições úteis para regular, por exemplo, aprimorar, expressão de gene *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*. A expressão de gene pode ser, por exemplo, em células animais e outras células eucariontes. O gene pode ser, por exemplo, um gene heterólogo que codifica uma proteína de interesse.

[008] Em um aspecto, algumas modalidades reveladas no presente documento se referem a uma molécula de ácido nucleico, que inclui (i) uma primeira sequência de ácidos nucleicos que codifica uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA de um aperfeiçoador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo; e (ii) uma segunda sequência de ácidos nucleicos ligada de modo operável à primeira sequência de ácidos nucleicos, em que a segunda sequência de ácidos nucleicos compreende uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI).

[009] Implantações de modalidades da molécula de ácido nucleico de acordo com a presente revelação pode incluir um ou mais dos seguintes recursos. Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante à sequência de codificação para o GOI. Em algumas modalidades, a molécula de ácido

nucleico inclui ainda um promotor ligado de modo operável a montante à primeira sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico inclui ainda uma sequência de 5' UTR ligada de modo operável a montante à primeira sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, a sequência de 5' UTR é ligada de modo operável a jusante ao promotor e a montante à primeira sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico inclui ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease ligado de modo operável a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, a sequência de codificação para o peptídeo de auto-protease é ligada de modo operável a jusante à primeira sequência de ácidos nucleicos e a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, o peptídeo de auto-protease compreende uma sequência de peptídeos selecionada a partir do grupo que consiste em teschovírus-1 2A porcino (P2A), um vírus de febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um Vírus de Rinite Equina A (ERAV) 2A (E2A), um vírus Thosea asigna 2A (T2A), um vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A), um Vírus Flacherie 2A (BmIFV2A) e uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico inclui ainda uma sequência de 3' UTR ligada de modo operável a jusante à segunda sequência de ácidos nucleicos.

[010] Em algumas modalidades, o aperfeiçoador de capsídeo viral é derivado de um gene de capsídeo de uma espécie de vírus que pertence à família Togaviridae. Em algumas modalidades, a espécie de vírus pertence ao gênero Alfavírus da família Togaviridae. Em algumas modalidades, a espécie de alfavírus é vírus de encefalite equina oriental (EEEV), vírus de encefalite equina venezuelana (VEEV), vírus Everglades (EVEV), vírus Mucambo (MUCV), vírus da floresta Semliki (SFV), vírus Pixuna (PIXV), vírus Middleburg (MIDV), vírus da Chikungunya (CHIKV), vírus da O'Nyong-Nyong (ONNV), vírus de Ross River (RRV), vírus da floresta Barmah (BF), vírus de Getah (GET), vírus de Sagiya (SAGV), vírus de Bebaru (BEBV), vírus de Mayaro (MAYV), vírus de Una (UNAV), vírus de Sindbis (SINV), vírus de Aura (AURAV), vírus de Whataroa (WHAV), vírus de Babanki (BABV), vírus de Kyzylagach (KYZV), vírus de encefalite equina ocidental (WEEV), vírus Highland J (HJV), vírus Fort Morgan (FMV), Ndumu (NDUV), alfavírus Salmonidae (SAV) ou vírus de Buggy Creek. Em algumas modalidades, o aperfeiçoador de capsídeo viral compreende um motivo de laço a jusante (DLP) da espécie de vírus, e em que o motivo de DLP compreende pelo menos uma dentre a uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA. Em algumas modalidades, o aperfeiçoador de capsídeo viral compreende uma sequência de ácidos nucleicos que exibe pelo menos 80% de identidade de sequência para pelo menos uma

dentre as SEQ ID NOs: 1 e 46 a 52. Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos exibe pelo menos 95% de identidade de sequência para pelo menos uma dentre as SEQ ID NOs: 1 e 46 a 52.

[011] Em algumas modalidades, a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico, um polipeptídeo profilático, um polipeptídeo de diagnóstico, um polipeptídeo nutracêutico, uma enzima industrial, um polipeptídeo repórter ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um anticorpo, um antígeno, um modulador imune, uma citocina, uma enzima ou uma combinação dos mesmos.

[012] Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da revelação inclui ainda uma terceira sequência de ácidos nucleicos que codifica uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA de um segundo aperfeiçoador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo; e uma quarta sequência de ácidos nucleicos ligada de modo operável à terceira sequência de ácidos nucleicos, em que a quarta sequência de ácidos nucleicos compreende uma sequência de codificação para um segundo gene de interesse (GOI). Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico inclui ainda uma sequência de codificação para um segundo peptídeo de auto-protease ligado de modo operável a jusante à terceira sequência de ácidos

nucleicos e a montante à quarta sequência de ácidos nucleicos.

[013] Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da revelação é uma molécula de mRNA ou um replicação de RNA. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico é um vetor de expressão ou um vetor de transcrição. Em algumas modalidades, o vetor de expressão ou um vetor de transcrição inclui ainda uma ou mais sequências reguladoras de transcrição adicionais. Em algumas modalidades, o vetor de expressão ou um vetor de transcrição inclui ainda uma ou mais sequências reguladoras de transcrição adicionais. Em algumas modalidades, o vetor de expressão ou um vetor de transcrição inclui ainda uma ou mais sequências reguladoras de translação adicionais. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico é um plasmídeo, um vetor bacteriófago, um cosmídeo, um fosmídeo, um replicação viral, um vetor transportador ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico é um vetor procarionte ou um vetor eucarionte. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico é produzida por meio de síntese de novo.

[014] Também revelado em algumas modalidades inclui um método para produzir um polipeptídeo de interesse em uma célula, o qual inclui introduzir uma molécula de ácido nucleico, de acordo com a presente revelação, em uma célula

produzindo, desse modo, um polipeptídeo codificado pelo GOI na célula. Em ainda outro aspecto relacionado, algumas modalidades reveladas no presente documento relacionadas a um método para produzir um polipeptídeo de interesse em uma célula, o qual inclui introduzir uma molécula de RNA na célula, em que a molécula de RNA compreende uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA de um aperfeiçoador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo, e uma sequência de codificação para o polipeptídeo de interesse produzindo, desse modo, o polipeptídeo de interesse na célula.

[015] Em algumas modalidades, a molécula de RNA é uma molécula de RNA mensageiro (mRNA) ou uma molécula de RNA replicação. Em algumas modalidades, a molécula de RNA é produzida por meio de síntese de novo e/ou transcrição in vitro antes de ser introduzida na célula. Em algumas modalidades, a molécula de RNA compreende um motivo de laço a jusante (DLP) de uma espécie de vírus, e em que o motivo de DLP compreende pelo menos uma dentre a uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA do aperfeiçoador de capsídeo viral. Em algumas modalidades, a molécula de RNA compreende ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease a jusante para pelo menos uma dentre a uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA e a montante à sequência de codificação para o polipeptídeo de interesse. Em algumas modalidades, o peptídeo de auto-protease compreende uma

sequência de peptídeos selecionada a partir do grupo que consiste em teschovírus-1 2A porcino (P2A), um vírus de febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um Vírus de Rinite Equina A (ERAV) 2A (E2A), um vírus Thosea asigna 2A (T2A), um vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A), um Vírus Flacherie 2A (BmIFV2A) e uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico, um polipeptídeo profilático, um polipeptídeo de diagnóstico, um polipeptídeo nutracêutico, uma enzima industrial, um polipeptídeo repórter ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um anticorpo, um antígeno, um modulador imune, uma citocina, uma enzima ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a célula está presente em um tecido, um órgão ou um indivíduo. Em algumas modalidades, o indivíduo é ser humano, cavalo, porco, primata, camundongo, furão, rato, sigmodon, gado, suíno, ovelhas, coelho, gato, cachorro, ave, peixe, cabra, burro, hamster ou búfalo.

[016] Algumas modalidades revelam um método para produzir um RNA mensageiro (mRNA) em uma célula. O método, em algumas modalidades, inclui administrar à célula uma molécula de ácido nucleico que compreende uma primeira sequência de ácidos nucleicos que codifica uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA de um aperfeiçoador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo, e uma segunda

sequência de ácidos nucleicos ligada de modo operável à primeira sequência de ácidos nucleicos, em que a segunda sequência de ácidos nucleicos compreende uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI) produzindo, desse modo, um mRNA do GOI.

[017] Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante à sequência de codificação para o GOI. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico inclui ainda um promotor ligado de modo operável a montante à primeira sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico inclui ainda uma sequência de 5' UTR ligada de modo operável a montante à primeira sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, a sequência de 5' UTR é ligada de modo operável a jusante ao promotor e a montante à primeira sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico inclui ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease ligado de modo operável a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, a sequência de codificação para o peptídeo de auto-protease é ligada de modo operável a jusante à primeira sequência de ácidos nucleicos e a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, o peptídeo de auto-protease compreende uma sequência de peptídeos selecionada a partir do grupo que

consiste em teschovírus-1 2A porcino (P2A), um vírus de febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um Vírus de Rinite Equina A (ERAV) 2A (E2A), um vírus Thosea asigna 2A (T2A), um vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A), um Vírus Flacherie 2A (BmIFV2A) e uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico inclui ainda uma sequência de 3' UTR ligada de modo operável a jusante à segunda sequência de ácidos nucleicos.

[018] Em algumas modalidades reveladas no presente documento, o aperfeiçoador de capsídeo viral é derivado de um gene de capsídeo de uma espécie de vírus que pertence à família Togaviridae. Em algumas modalidades, a espécie de vírus pertence ao gênero Alfavírus da família Togaviridae. Em algumas modalidades, a espécie de alfavírus é vírus de encefalite equina oriental (EEEV), vírus de encefalite equina venezuelana (VEEV), vírus Everglades (EVEV), vírus Mucambo (MUCV), vírus da floresta Semliki (SFV), vírus Pixuna (PIXV), vírus Middleburg (MIDV), vírus da Chikungunya (CHIKV), vírus da O'Nyong-Nyong (ONNV), vírus de Ross River (RRV), vírus da floresta Barmah (BF), vírus de Getah (GET), vírus de Sagiyama (SAGV), vírus de Bebaru (BEBV), vírus de Mayaro (MAYV), vírus de Una (UNAV), vírus de Sindbis (SINV), vírus de Aura (AURAV), vírus de Whataroa (WHAV), vírus de Babanki (BABV), vírus de Kyzylagach (KYZV), vírus de encefalite equina ocidental (WEEV), vírus Highland J (HJV),

vírus Fort Morgan (FMV), Ndumu (NDUV), alfavírus Salmonidae (SAV) ou vírus de Buggy Creek. Em algumas modalidades, o aperfeiçoador de capsídeo viral compreende um motivo de laço a jusante (DLP) da espécie de vírus, e em que o motivo de DLP compreende pelo menos uma dentre a uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA. Em algumas modalidades, o aperfeiçoador de capsídeo viral compreende uma sequência de ácidos nucleicos que exhibe pelo menos 80% de identidade de sequência para pelo menos uma dentre as SEQ ID NOs: 1 e 46 a 52. Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos exhibe pelo menos 95% de identidade de sequência para pelo menos uma dentre as SEQ ID NOs: 1 e 46 a 52.

[019] Em algumas modalidades reveladas no presente documento, a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é selecionado a partir do grupo que consiste em um polipeptídeo terapêutico, um polipeptídeo profilático, um polipeptídeo de diagnóstico, um polipeptídeo nutracêutico, uma enzima industrial, um polipeptídeo repórter e uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um anticorpo, um antígeno, um modulador imune, uma citocina, uma enzima ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades do método para produzir um RNA mensageiro (mRNA), de acordo com a presente revelação, a molécula de ácido nucleico inclui ainda uma terceira sequência de ácidos

nucleicos que codifica uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA de um segundo aperfeiçoador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo; e uma quarta sequência de ácidos nucleicos ligada de modo operável à terceira sequência de ácidos nucleicos, em que a quarta sequência de ácidos nucleicos compreende uma sequência de codificação para um segundo gene de interesse (GOI). Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico inclui ainda uma sequência de codificação para um segundo peptídeo de auto-protease ligado de modo operável a jusante à terceira sequência de ácidos nucleicos e a montante à quarta sequência de ácidos nucleicos.

[020] A molécula de ácido nucleico da presente revelação pode ser, em algumas modalidades, um replicão de RNA. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico é um vetor de expressão ou um vetor de transcrição. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende ainda uma ou mais sequências reguladoras de transcrição adicionais. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende ainda. Em algumas modalidades, uma ou mais sequências reguladoras de translação adicionais. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico é um vetor de expressão selecionado a partir do grupo que consiste em um plasmídeo, um vetor bacteriófago, um cosmídeo, um fosmídeo, um replicão viral, um vetor transportador e uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a molécula de

ácido nucleico é um vetor procarionte de expressão ou um vetor eucarionte de expressão. Em algumas modalidades, a célula está presente em um tecido, um órgão ou um indivíduo. Em algumas modalidades, o indivíduo é ser humano, cavalo, porco, primata, camundongo, furão, rato, sigmodon, gado, suíno, ovelhas, coelho, gato, cachorro, ave, peixe, cabra, burro, hamster ou búfalo. Em algumas modalidades o método para produzir um RNA mensageiro (mRNA), de acordo com a presente revelação, inclui ainda produzir um polipeptídeo codificado pelo mRNA do GOI na célula. Em algumas modalidades, o método inclui ainda obter o mRNA produzido do GOI e introduzir o mRNA obtido em uma segunda célula para expressão de um polipeptídeo codificado pelo mRNA do GOI na segunda célula.

[021] Em um aspecto, algumas modalidades da revelação se referem à molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um replicação de RNA viral modificado, em que o replicação de RNA viral modificado compreende (i) uma primeira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo, em que o aperfeiçoador de capsídeo viral é heterólogo ao replicação de RNA viral, e (ii) uma segunda sequência de ácidos nucleicos que codifica pelo menos uma proteína viral não estrutural ou uma porção da mesma, em que

a primeira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos.

[022] Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais elementos estruturais do aperfeiçoador de capsídeo viral compreende uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA. Em algumas modalidades, o aperfeiçoador de capsídeo viral é derivado de um gene de capsídeo de uma espécie de vírus que pertence à família Togaviridae. Em algumas modalidades, a espécie de vírus pertence ao gênero Alfavírus da família Togaviridae. Em algumas modalidades, a espécie de alfavírus é vírus de encefalite equina oriental (EEEV), vírus de encefalite equina venezuelana (VEEV), vírus Everglades (EVEV), vírus Mucambo (MUCV), vírus da floresta Semliki (SFV), vírus Pixuna (PIXV), vírus Middleburg (MIDV), vírus da Chikungunya (CHIKV), vírus da O'Nyong-Nyong (ONNV), vírus de Ross River (RRV), vírus da floresta Barmah (BF), vírus de Getah (GET), vírus de Sagiya (SAGV), vírus de Bebaru (BEBV), vírus de Mayaro (MAYV), vírus de Una (UNAV), vírus de Sindbis (SINV), vírus de Aura (AURAV), vírus de Whataroa (WHAV), vírus de Babanki (BABV), vírus de Kyzylagach (KYZV), vírus de encefalite equina ocidental (WEEV), vírus Highland J (HJV), vírus Fort Morgan (FMV), Ndumu (NDUV) ou vírus de Buggy Creek. Em algumas modalidades, o aperfeiçoador de capsídeo viral compreende um motivo de laço a jusante (DLP) da espécie de vírus, e em que o motivo de DLP compreende

pelo menos uma dentre a uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA. Em algumas modalidades, o aperfeiçoador de capsídeo viral compreende uma sequência de ácidos nucleicos que exhibe pelo menos 80% de identidade de sequência para pelo menos uma dentre as SEQ ID NOs: 1 e 46 a 52. Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos exhibe pelo menos 95% de identidade de sequência para pelo menos uma dentre as SEQ ID NOs: 1 e 46 a 52.

[023] Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o replicação de RNA viral modificado compreende ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease ligado de modo operável a jusante à primeira sequência de ácidos nucleicos e a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, o peptídeo de auto-protease compreende uma sequência de peptídeos selecionada a partir do grupo que consiste em teschovírus-1 2A porcino (P2A), um vírus de febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um Vírus de Rinite Equina A (ERAV) 2A (E2A), um vírus Thosea asigna 2A (T2A), um vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A), um Vírus Flacherie 2A (BmIFV2A) ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos é posicionada de modo operável dentro de uma região de cerca de 1 a 1.000 nucleotídeos a jusante do terminal 5' do replicação de RNA viral modificado. A segunda sequência de

ácidos nucleicos compreende substancialmente toda a sequência de codificação para as proteínas não estruturais virais nativas do replicação de RNA viral não modificado correspondente.

[024] Em algumas modalidades reveladas no presente documento, o replicação de RNA viral modificado compreende um replicação de RNA modificado derivado de uma espécie de vírus que pertence ao gênero Alfavírus da família Togaviridae ou ao gênero Arterivírus da família Arteriviridae.

[025] Em algumas modalidades, a espécie de vírus arterivírus é vírus de arterite equina (EAV), vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRSV), vírus de elevação de desidrogenase de lactato (LDV) ou vírus da febre hemorrágica Simiana (SHFV). Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos é posicionada de modo operável a montante a uma segunda sequência de ácidos nucleicos que codifica uma porção ou toda a proteína não estrutural p1ab do replicação de RNA de artevírus modificado. Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o replicação de RNA de artevírus modificado compreende ainda um ou mais cassetes de expressão, em que pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão compreende um promotor ligado de modo operável a uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI). Em algumas modalidades, o replicação de RNA de artevírus modificado

compreende pelo menos dois, três, quatro, cinco ou seis cassetes de expressão. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão é ligado de modo operável a jusante da segunda sequência de ácidos nucleicos que codifica uma porção ou toda a proteína não estrutural pplab do replicação de RNA de artevírus modificado. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão é posicionado de modo operável a jusante para uma sequência reguladora transcricional (TRS) do replicação de RNA de artevírus modificado, em que a TRS é TRS1, TRS2, TRS3, TRS4, TRS5, TRS6 ou TRS7. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão compreende ainda uma terceira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral, em que a terceira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante à sequência de codificação para o GOI.

[026] Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o replicação de RNA de artevírus modificado compreende ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease ligado de modo operável a jusante à terceira sequência de ácidos nucleicos e a montante à sequência de codificação para o GOI. Em algumas modalidades, a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo terapêutico, um polipeptídeo profilático, um

polipeptídeo de diagnóstico, um polipeptídeo nutracêutico, uma enzima industrial, um polipeptídeo repórter ou qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a sequência de codificação para o GOI codifica um anticorpo, um antígeno, um modulador imune, uma citocina, uma enzima ou qualquer combinação dos mesmos.

[027] Em algumas modalidades, a replicação de RNA viral modificado compreende a replicação de RNA modificado derivado de uma espécie de alfavírus de vírus selecionada a partir do grupo que consiste em vírus de encefalite equina oriental (EEEV), vírus de encefalite equina venezuelana (VEEV), vírus Everglades (EVEV), vírus Mucambo (MUCV), vírus da floresta Semliki (SFV), vírus Pixuna (PIXV), vírus Middleburg (MIDV), vírus da Chikungunya (CHIKV), vírus da O'Nyong-Nyong (ONNV), vírus de Ross River (RRV), vírus da floresta Barmah (BF), vírus de Getah (GET), vírus de Sagiyama (SAGV), vírus de Bebaru (BEBV), vírus de Mayaro (MAYV), vírus de Una (UNAV), vírus de Sindbis (SINV), vírus de Aura (AURAV), vírus de Whataroa (WHAV), vírus de Babanki (BABV), vírus de Kyzylagach (KYZV), vírus de encefalite equina ocidental (WEEV), vírus Highland J (HJV), vírus Fort Morgan (FMV), Ndumu (NDUV), alfavírus Salmonidae (SAV) e vírus de Buggy Creek. Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos é posicionada de modo operável a montante de uma segunda sequência de ácidos nucleicos que codifica

uma ou mais proteínas não estruturais nspl-4 ou uma porção da mesma do replicação de RNA de alfavírus modificado. Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o replicação de RNA de alfavírus modificado compreende ainda um ou mais cassetes de expressão, em que cada um dos cassetes de expressão compreende um promotor ligado de modo operável a uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI). Em algumas modalidades, o replicação de RNA de alfavírus modificado compreende pelo menos dois, três, quatro, cinco ou seis cassetes de expressão. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão é ligado de modo operável a jusante de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma ou mais proteínas não estruturais nspl-4 ou uma porção da mesma do replicação de RNA de alfavírus modificado. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão compreende ainda uma terceira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral, em que a terceira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante da sequência de codificação para o GOI. Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o replicação de RNA de alfavírus modificado compreende ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease ligado de modo operável a jusante à terceira sequência de

ácidos nucleicos e a montante à sequência de codificação para o GOI. Em algumas modalidades, a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo terapêutico, um polipeptídeo profilático, um polipeptídeo de diagnóstico, um polipeptídeo nutracêutico, uma enzima industrial, um polipeptídeo repórter ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a sequência de codificação para o GOI codifica um anticorpo, um antígeno, um modulador imune, uma enzima, uma citocina ou uma combinação dos mesmos.

[028] Em um aspecto, algumas modalidades da revelação se referem a uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um replicação de RNA de não alfavírus modificado, em que o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende uma primeira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo. Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende ainda uma segunda sequência de ácidos nucleicos que codifica pelo menos uma proteína viral não estrutural ou uma porção da mesma, em que a primeira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o replicação de RNA de não alfavírus modificado

compreende ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease ligado de modo operável a jusante à primeira sequência de ácidos nucleicos e a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, o peptídeo de auto-protease compreende uma sequência de peptídeos selecionada a partir do grupo que consiste em teschovírus-1 2A porcino (P2A), um vírus de febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um Vírus de Rinite Equina A (ERAV) 2A (E2A), um vírus Thosea asigna 2A (T2A), um vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A), um Vírus Flacherie 2A (BmIFV2A) ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende um replicação de RNA modificado derivado de um vírus de RNA de filamento positivo. Em algumas modalidades, o vírus de RNA de filamento positivo é uma espécie de vírus que pertence a uma família selecionada a partir do grupo que consiste em família Togaviridae, família Flaviviridae, família Orthomyxoviridae, família Rhabdoviridae e família Paramyxoviridae. Em algumas modalidades, o vírus de RNA de filamento positivo é uma espécie de vírus que pertence ao gênero Arterivírus da família Arteriviridae.

[029] Em algumas modalidades reveladas no presente documento, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende ainda

um ou mais cassetes de expressão, em que cada um dos cassetes de expressão compreende um promotor ligado de modo operável a uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI). Em algumas modalidades, o replicão de RNA de não alfavírus modificado compreende pelo menos dois, três, quatro, cinco ou seis cassetes de expressão. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão é ligado de modo operável a jusante da segunda sequência de ácidos nucleicos que codifica a pelo menos uma proteína viral não estrutural ou uma porção da mesma. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão compreende ainda uma terceira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral, em que a terceira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante à sequência de codificação para o GOI. Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o replicão de RNA de não alfavírus modificado compreende ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease ligado de modo operável a jusante à terceira sequência de ácidos nucleicos e a montante à sequência de codificação para o GOI. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico é produzida por meio de síntese *de novo*.

[030] Em um aspecto, algumas modalidades reveladas

no presente documento se referem a uma célula recombinante que inclui uma molécula de ácido nucleico como revelado no presente documento. Em algumas modalidades, a célula recombinante é uma célula procarionte ou uma célula eucarionte. Em algumas modalidades, a célula recombinante é uma célula animal. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um replicação de RNA modificado, e em que expressão do RNA de replicação modificado confere uma resistência a resposta imune inata na célula recombinante. Em um aspecto relacionado, algumas modalidades reveladas no presente documento se referem a uma cultura de células que inclui pelo menos uma célula recombinante como revelado no presente documento.

[031] Em alguns aspectos, algumas modalidades reveladas no presente documento se referem a um método para conferir uma resistência ao sistema imune inato em um indivíduo que inclui administrar ao indivíduo uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um replicação de RNA viral modificado, em que o replicação de RNA viral modificado compreende (i) uma primeira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo, em que o aperfeiçoador de capsídeo viral é heterólogo ao replicação de RNA viral, e (ii)

uma segunda sequência de ácidos nucleicos que codifica pelo menos uma proteína não estrutural ou uma porção da mesma, em que a primeira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos, e em que expressão do RNA de replicação modificado codificado pela molécula de ácido nucleico confere uma resistência a resposta imune inata no indivíduo. Em algumas modalidades, o indivíduo é selecionado a partir do grupo que consiste em ser humano, cavalo, porco, primata, camundongo, furão, rato, sigmodon, gado, suíno, ovelhas, coelho, gato, cachorro, ave, peixe, cabra, burro, hamster e búfalo.

[032] Em algum aspecto, algumas modalidades reveladas no presente documento se referem a um método para produzir um polipeptídeo de interesse em um indivíduo que inclui administrar ao indivíduo uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um replicação de RNA viral modificado, em que o replicação de RNA viral modificado compreende (i) uma primeira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo, em que o aperfeiçoador de capsídeo viral é heterólogo ao replicação de RNA viral, e (ii) uma segunda sequência de ácidos nucleicos que codifica pelo menos uma proteína não estrutural ou uma porção da mesma, em que a primeira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo

operável a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, o indivíduo é ser humano, cavalo, porco, primata, camundongo, furão, rato, sigmodon, gado, suíno, ovelhas, coelho, gato, cachorro, ave, peixe, cabra, burro, hamster ou búfalo.

[033] Em algum aspecto, algumas modalidades reveladas no presente documento se referem a um método para produzir um polipeptídeo de interesse, que inclui cultivar uma célula hospedeira que compreende uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um replicação de RNA viral modificado, em que o replicação de RNA viral modificado compreende (i) uma primeira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo, em que o aperfeiçoador de capsídeo viral é heterólogo ao replicação de RNA viral, e (ii) uma segunda sequência de ácidos nucleicos que codifica pelo menos uma proteína não estrutural ou uma porção da mesma, em que a primeira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos.

[034] Em algumas modalidades do método para produzir um polipeptídeo de interesse de acordo com a presente revelação, o indivíduo é selecionado a partir do grupo que consiste em ser humano, cavalo, porco, primata, camundongo, furão, rato, sigmodon, gado, suíno, ovelhas,

coelho, gato, cachorro, ave, peixe, cabra, burro, hamster e búfalo. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais elementos estruturais do aperfeiçoador de capsídeo viral compreende uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA. Em algumas modalidades, o aperfeiçoador de capsídeo viral é derivado de um gene de capsídeo de uma espécie de vírus que pertence à família Togaviridae. Em algumas modalidades, a espécie de vírus pertence ao gênero Alfavírus da família Togaviridae. Em algumas modalidades, a espécie de alfavírus é vírus de encefalite equina oriental (EEEV), vírus de encefalite equina venezuelana (VEEV), vírus Everglades (EVEV), vírus Mucambo (MUCV), vírus da floresta Semliki (SFV), vírus Pixuna (PIXV), vírus Middleburg (MIDV), vírus da Chikungunya (CHIKV), vírus da O'Nyong-Nyong (ONNV), vírus de Ross River (RRV), vírus da floresta Barmah (BF), vírus de Getah (GET), vírus de Sagiyama (SAGV), vírus de Bebaru (BEBV), vírus de Mayaro (MAYV), vírus de Una (UNAV), vírus de Sindbis (SINV), vírus de Aura (AURAV), vírus de Whataroa (WHAV), vírus de Babanki (BABV), vírus de Kyzylagach (KYZV), vírus de encefalite equina ocidental (WEEV), vírus Highland J (HJV), vírus Fort Morgan (FMV), Ndumu (NDUV), ou vírus de Buggy Creek. Em algumas modalidades, o aperfeiçoador de capsídeo viral compreende um motivo de laço a jusante (DLP) da espécie de vírus, e em que o motivo de DLP compreende pelo menos uma dentre a uma ou mais estruturas de haste-laço

de RNA. Em algumas modalidades, o aperfeiçoador de capsídeo viral compreende uma sequência de ácidos nucleicos que exibe pelo menos 80% de identidade de sequência para pelo menos uma dentre as SEQ ID NOs: 1 e 46 a 52. Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos exibe pelo menos 95% de identidade de sequência para pelo menos uma dentre as SEQ ID NOs: 1 e 46 a 52.

[035] Em algumas modalidades reveladas no presente documento, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o replicação de RNA viral modificado compreende ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease ligado de modo operável a jusante à primeira sequência de ácidos nucleicos e a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, o peptídeo de auto-protease compreende uma sequência de peptídeos selecionada a partir do grupo que consiste em teschovírus-1 2A porcino (P2A), um vírus de febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um Vírus de Rinite Equina A (ERAV) 2A (E2A), um vírus Thosa asigna 2A (T2A), um vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A), um Vírus Flacherie 2A (BmIFV2A) ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos é posicionada de modo operável dentro de uma região de cerca de 1 para 1.000 nucleotídeos a jusante do terminal 5' do replicação de RNA viral modificado. A segunda sequência de ácidos nucleicos compreende substancialmente toda a

sequência de codificação para as proteínas não estruturais virais nativas do replicação de RNA viral não modificado correspondente.

[036] Em algumas modalidades, o replicação de RNA viral modificado compreende um replicação de RNA modificado derivado de uma espécie de vírus que pertence ao gênero Alfavírus da família Togaviridae ou ao gênero Arterivírus da família Arteriviridae. Em algumas modalidades, a espécie de vírus arterivírus é vírus de arterite equina (EAV), vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRSV), vírus de elevação de desidrogenase de lactato (LDV) ou vírus da febre hemorrágica Simiana (SHFV).

[037] Em algumas modalidades reveladas no presente documento, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o replicação de RNA de artevírus modificado compreende ainda um ou mais cassetes de expressão, e em que pelo menos um dos cassetes de expressão compreende um promotor ligado de modo operável a uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI). Em algumas modalidades, a espécie de vírus é um arterivírus, e em que a primeira sequência de ácidos nucleicos é posicionada de modo operável a montante a uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma porção ou toda a proteína não estrutural p1ab do replicação de RNA de artevírus modificado. Em algumas modalidades, o replicação de RNA de artevírus modificado compreende ainda pelo menos dois,

três, quatro, cinco ou seis cassetes de expressão. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão é ligado de modo operável a jusante da segunda sequência de ácidos nucleicos que codifica uma porção ou toda a proteína não estrutural p1ab do replicão de RNA de artevírus modificado. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão é posicionado de modo operável a jusante para uma sequência reguladora transcricional (TRS) do replicão de RNA de artevírus modificado, em que a TRS é TRS1, TRS2, TRS3, TRS4, TRS5, TRS6 ou TRS7. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão compreende ainda uma terceira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral, em que a terceira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante à sequência de codificação para o GOI. Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o replicão de RNA de artevírus modificado compreende ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease ligado de modo operável a jusante à terceira sequência de ácidos nucleicos e a montante à sequência de codificação para o GOI. Em algumas modalidades, a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo terapêutico, um polipeptídeo profilático, um polipeptídeo de diagnóstico, um polipeptídeo nutracêutico,

uma enzima industrial, um polipeptídeo repórter ou qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a sequência de codificação para o GOI codifica um anticorpo, um antígeno, um modulador imune, uma citocina, uma enzima ou qualquer combinação dos mesmos.

[038] Em algumas modalidades, a replicação de RNA viral modificado compreende a replicação de RNA modificado derivado de uma espécie de alfavírus de vírus selecionada a partir do grupo que consiste em vírus de encefalite equina oriental (EEEV), vírus de encefalite equina venezuelana (VEEV), vírus Everglades (EVEV), vírus Mucambo (MUCV), vírus da floresta Semliki (SFV), vírus Pixuna (PIXV), vírus Middleburg (MIDV), vírus da Chikungunya (CHIKV), vírus da O'Nyong-Nyong (ONNV), vírus de Ross River (RRV), vírus da floresta Barmah (BF), vírus de Getah (GET), vírus de Sagiyama (SAGV), vírus de Bebaru (BEBV), vírus de Mayaro (MAYV), vírus de Una (UNAV), vírus de Sindbis (SINV), vírus de Aura (AURAV), vírus de Whataroa (WHAV), vírus de Babanki (BABV), vírus de Kyzylagach (KYZV), vírus de encefalite equina ocidental (WEEV), vírus Highland J (HJV), vírus Fort Morgan (FMV), Ndumu (NDUV), alfavírus Salmonidae (SAV) e vírus de Buggy Creek. Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos é posicionada de modo operável a montante de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma ou mais proteínas não estruturais nspl-4 ou uma porção da mesma

do replicação de RNA de alfavírus modificado.

[039] Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos que codifica o replicação de RNA de alfavírus modificado compreende ainda um ou mais cassetes de expressão, em que cada um dos cassetes de expressão compreende um promotor ligado de modo operável a uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI). Em algumas modalidades, o replicação de RNA de alfavírus modificado compreende pelo menos dois, três, quatro, cinco ou seis cassetes de expressão. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão é ligado de modo operável a jusante de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma ou mais proteínas não estruturais nspl-4 ou uma porção da mesma do replicação de RNA de alfavírus modificado. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão compreende ainda uma terceira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral, em que a terceira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante da sequência de codificação para o GOI. Em algumas modalidades, o replicação de RNA de alfavírus modificado compreende ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease ligado de modo operável a jusante à terceira sequência de ácidos nucleicos e a montante à sequência de codificação para o GOI. Em algumas

modalidades, a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo terapêutico, um polipeptídeo profilático, um polipeptídeo de diagnóstico, um polipeptídeo nutracêutico, uma enzima industrial, um polipeptídeo repórter ou qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, a sequência de codificação para o GOI codifica um anticorpo, um antígeno, um modulador imune, uma citocina, uma enzima ou qualquer combinação dos mesmos.

[040] Em outro aspecto, algumas modalidades reveladas no presente documento se referem a um método para conferir uma resistência ao sistema imune inato em um indivíduo, que compreende administrar ao indivíduo uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um replicação de RNA de não alfavírus modificado, em que o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende uma primeira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo de alfavírus e em que expressão do replicação de RNA de não alfavírus modificado codificado pela molécula de ácido nucleico confere uma resistência a resposta imune inata no indivíduo. Em algumas modalidades, o indivíduo é selecionado a partir do grupo que consiste em ser humano, cavalo, porco, primata, camundongo, furão, rato, sigmodon, gado, suíno, ovelhas, coelho, gato, cachorro, ave, peixe, cabra, burro, hamster e

búfalo.

[041] Também revelado no presente documento inclui um método para produzir um polipeptídeo de interesse em um indivíduo, em que o método compreende administrar ao indivíduo uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um replicação de RNA de não alfavírus modificado, em que o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende uma primeira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo de alfavírus. Em algumas modalidades, o indivíduo é ser humano, cavalo, porco, primata, camundongo, furão, rato, sigmodon, gado, suíno, ovelhas, coelho, gato, cachorro, ave, peixe, cabra, burro, hamster ou búfalo.

[042] Algumas modalidades reveladas no presente documento se referem a um método para produzir um polipeptídeo de interesse, em que o método compreende cultivar uma célula hospedeira que compreende uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um replicação de RNA de não alfavírus modificado, em que o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende uma primeira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo de alfavírus.

[043] Em algumas modalidades de acordo com os

aspectos acima da revelação, o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende ainda uma segunda sequência de ácidos nucleicos que codifica pelo menos uma proteína viral não estrutural ou uma porção da mesma, em que a primeira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease ligado de modo operável a jusante à primeira sequência de ácidos nucleicos e a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades o peptídeo de auto-protease compreende uma sequência de peptídeos selecionada a partir do grupo que consiste em teschovírus-1 2A porcino (P2A), um vírus de febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um Vírus de Rinite Equina A (ERAV) 2A (E2A), um vírus Thosea asigna 2A (T2A), um vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A), um Vírus Flacherie 2A (BmIFV2A) e uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende um replicação de RNA modificado derivado de um vírus de RNA de filamento positivo. Em algumas modalidades, o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende um replicação de RNA modificado derivado de uma espécie de vírus que pertence à *família* Togaviridae, *família* Flaviviridae, *família* Orthomyxoviridae, *família* Rhabdoviridae, ou *família*

Paramyxoviridae. Em algumas modalidades, o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende um replicação de RNA modificado derivado de uma espécie de vírus que pertence ao gênero Arterivírus da família Arteriviridae. Em algumas modalidades, a sequência que codifica o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende ainda um ou mais cassetes de expressão, em que cada um dos cassetes de expressão compreende um promotor ligado de modo operável a uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI). Em algumas modalidades, o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende pelo menos dois, três, quatro, cinco ou seis cassetes de expressão. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão é ligado de modo operável a jusante da segunda sequência de ácidos nucleicos que codifica a pelo menos uma proteína viral não estrutural ou uma porção da mesma do replicação de RNA de não alfavírus modificado. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão compreende ainda uma terceira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo de alfavírus, em que a terceira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante à sequência de codificação para o GOI. Em algumas modalidades, o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease

ligado de modo operável a jusante à terceira sequência de ácidos nucleicos e a montante à sequência de codificação para o GOI.

[044] Em alguns aspectos, algumas modalidades reveladas no presente documento se referem a polipeptídeos recombinantes produzidos por um método de acordo com uma ou mais modalidades descritas no presente documento.

[045] Algumas modalidades reveladas no presente documento se referem a uma composição que inclui um polipeptídeo recombinante como descrito no presente documento e um carreador farmacologicamente aceitável.

[046] Algumas modalidades reveladas no presente documento se referem a uma composição que inclui uma molécula de ácido nucleico como revelado no presente documento e um carreador farmacologicamente aceitável.

[047] Em algumas modalidades, uma ou mais dentre as composições e/ou moléculas do presente pedido, por exemplo, moléculas de ácido nucleico, replicões de RNA, e polipeptídeos, é adicionalmente formulado em uma formulação farmacêutica. Em algumas modalidades, uma ou mais dentre as composições e/ou moléculas do presente pedido é formulada em uma formulação farmacêutica com compostos covalentes, compostos não covalentes, composições físicas ou tampões farmacologicamente aceitáveis.

[048] Em algumas modalidades reveladas no presente

documento, uma ou mais dentre as composições e/ou moléculas do presente pedido, *por exemplo*, moléculas de ácido nucleico, replicões de RNA, e polipeptídeos, é adicionalmente formulada para uso como uma composição protetora (por exemplo, vacina) ou composição terapêutica. Em particular, composições protetoras produzidas de acordo com a presente revelação têm uma variedade de usos que incluem, porém, sem limitação, uso como vacinas e outros agentes terapêuticos, uso como agentes de diagnóstico e uso como antígenos na produção de anticorpos policlonais ou monoclonais.

[049] O sumário supraexposto é apenas ilustrativo e não se destina a ser limitante de qualquer forma. Além das modalidades e recursos ilustrativos descritos no presente documento, aspectos, modalidades, objetivos e recursos adicionais do pedido se tornarão totalmente aparentes a partir dos desenhos, da descrição detalhada e das reivindicações.

Breve descrição dos desenhos

[050] A **Figura 1** é uma ilustração gráfica de uma estrutura de haste-laço de RNA exemplificativa não limitante de um aperfeiçoador de capsídeo de alfavírus.

[051] As **Figuras 2A a 2D** são representações gráficas de quatro moléculas de ácido nucleico exemplificativas não limitantes da presente revelação, em que cada uma das moléculas de ácido nucleico compreende uma sequência de

codificação para um aperfeiçoador de capsídeo de alfavírus (por exemplo, motivo de DLP) e uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI), por exemplo, um gene repórter Firefly vermelho (rFF). **Figura 2A:** rEx-DLP-rFF; **Figura 2B:** rEx-DLP-pplab-rFF; **Figura 2C:** rEx-DLP-2A-pplab-rFF e **Figura 2D:** rEx-DLP-2A-pplab-DLP-rFF. DLP: Sequência de Laço a Jusante; 2A: peptídeo de auto-protease; pplab: sequência de polipeptídeos não estrutural; e rFF: sequência de codificação para gene repórter Firefly vermelho.

[052] As **Figuras 3A a 3D** são ilustrações gráficas de quatro moléculas de ácido nucleico exemplificativas não limitantes da presente revelação, em que cada uma das moléculas de ácido nucleico compreende uma sequência de codificação para um aperfeiçoador de capsídeo de alfavírus (por exemplo, um motivo de DLP) e uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI), por exemplo, um gene repórter Firefly vermelho (rFF). **Figura 3A:** Alfa-R-rFF; **Figura 3B:** Alfa-R-DLP-rFF; **Figura 3C:** Alfa-R-DLP-2A-nsp-rFF e **Figura 3D:** Alfa-R-DLP-2A-nsp-DLP-rFF. DLP: Sequência de Laço a Jusante; 2A: peptídeo de auto-protease; nsp1-4: sequência de polipeptídeos não estrutural; e rFF: sequência de codificação para gene repórter Firefly vermelho.

[053] As **Figuras 4A a 4B** são ilustrações gráficas de duas outras moléculas de ácido nucleico exemplificativas não limitantes da presente revelação, em que cada uma das

moléculas de ácido nucleico compreende sequência de codificação para um aperfeiçoador de capsídeo de alfavírus (por exemplo, um motivo de DLP) e uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI), por exemplo, um gene repórter Firefly vermelho (rFF). **Figura 4A:** Alfa-R-DLP-2A-rFF e **Figura 4B:** Alfa-R-DLP-2A-nsp-DLP-2A-rFF. DLP: Sequência de Laço a Jusante; 2A: peptídeo de auto-protease; nsp1-4: sequência de polipeptídeos não estrutural; e rFF: sequência de codificação para gene repórter Firefly vermelho.

[054] As **Figuras 5A a 5B** sumarizam graficamente os resultados de análise de citometria de fluxo e análises de luciferase essencial realizada para demonstrar que incorporar um motivo de DLP a montante de sequência de ácidos nucleicos que codifica genes de proteína não estrutural de EAV ou um gene de interesse posicionado no RNA subgenômico, isto é, gene repórter rFF, não impactou negativamente replicação de RNA genômico. Nesses experimentos, análise de FACS (**Figura 5A**) e ensaios de luciferase de célula essencial (**Figura 5B**) foram realizados em células eletroporadas.

[055] As **Figuras 6A a B** sumarizam graficamente os resultados de outra análise de citometria de fluxo e análise de luciferase essencial exemplificativas realizadas para demonstrar que RNAs de replicação de arterivírus modificado com um motivo de DLP incorporado a montante da sequência que

codifica genes de proteína não estrutural podem se replicar e se expressar de forma eficiente em células hospedeiras que foram tratadas com IFN para induzir o sistema imune inato celular. Nesses experimentos, análise de FACS (**Figura 6A**) e ensaios de luciferase de célula essencial (**Figura 6B**) foram realizados em células eletroporadas. IFN foi adicionado a meios de cultura de células cinco horas pós-eletroporação. Amostras foram coletadas em triplicata dezoito horas pós-eletroporação para análise.

[056] As **Figuras 7A a C** sumarizam graficamente os resultados de outra análise de luciferase essencial exemplificativa realizada para demonstrar que RNAs de replicação de alfavírus modificados com um motivo de DLP incorporado a montante da sequência que codifica genes de proteína não estrutural podem se replicar e se expressar de forma eficiente em células hospedeiras que foram tratadas com IFN para induzir o sistema imune inato celular. Nesses experimentos, ensaios de luciferase de célula essencial foram realizados em células eletroporadas. IFN foi adicionado a meios de cultura de células imediatamente após eletroporação ou três horas pós-eletroporação. Amostras foram coletadas em triplicata dezoito horas pós-eletroporação para análise. **Figura 7A:** α -rFF versus construto alfa-R-rFF; **Figura 7B:** α -rFF versus α -DLP-2A-nsp-rFF e **Figura 7C:** α -rFF versus construto alfa-R-DLP-2A-nsp-

rFF.

[057] A **Figura 8** sumariza graficamente os resultados de experimentos *in vivo* exemplificativos realizados para demonstrar que RNAs de replicação de alfavírus modificados com um motivo de DLP incorporado a montante da sequência que codifica genes de proteína não estrutural podem se replicar e se expressar de forma eficiente em camundongos Balb/c. Nesses experimentos, imageamento de corpo inteiro de animais que foram injetados com um RNA de replicação de alfavírus modificado foi conduzido. Cada animal recebeu 7,5 µg de RNA de replicação injetado de forma intramuscular. Animais individuais foram imageados no dia 1, dia 3 e dia 7. Original: camundongos injetados com o construto alfa-R-rFF; DLP: camundongos injetados com o construto alfa-R-DLP-2A-nsp-rFF.

[058] A **Figura 9** retrata esquematicamente uma estrutura genômica e expressão de genoma de alfavírus não limitante exemplificativa (adaptada a partir de Strauss *et al.*, Microbiological Reviews, páginas 491 a 562, setembro de 1994). Organização de genoma de um vírus de Sindbis (SINV) é mostrada. Os nomes dos genes não estruturais e genes de proteína estrutural são dados. Referências à nomenclatura dos genes e proteínas podem ser encontradas em Strauss *et al.*, *supra*, 1994. O RNA genômico 49S é ilustrado esquematicamente no centro, com seu ORF transladoado mostrado

como uma caixa aberta. Pequenas caixas pretas são elementos de sequência conservados; o diamante aberto denota o códon de terminação opal vazante. As poliproteínas não estruturais e seus produtos processados são mostrados acima. A terminação no códon opal produz P123, cuja função principal em replicação acredita-se ser como uma proteinase que atua em trans para processar as poliproteínas em replicases de RNA ativas; esse domínio de proteinase é encontrado na região de nsP2. Leitura através do códon de terminação opal produz P1234, que pode formar uma replicase ativa. O mRNA subgenômico 26S é expandido abaixo para mostrar o ORF estrutural e seus produtos de translação. Polipeptídeos presentes no vírion são sombreados. O vcRNA é o complemento de filamento negativo do RNA genômico.

[059] A **Figura 10** retrata esquematicamente estrutura genômica e estratégia de expressão de genoma de EAV. Os nomes do gene de replicase e genes de proteína estrutural são dados (referências à nomenclatura de genes e proteínas podem ser encontradas em Snijder *et al.*, 2005). Abaixo a organização de genoma, as relações de estrutura do genoma e mRNAs de sg são retratados. A sequência e TRSs líderes encontrados no final 5' dos mRNAs de EAV são indicados como caixas azul e laranja, respectivamente. O elemento de deslocamento de quadro ribossômico (RFS) encontrado no comprimento do genoma mRNA1 é indicado e a

região transladada de cada mRNA é destacada por uma linha verde, enquanto que regiões silenciosas translacionalmente são indicadas por uma linha vermelha. Apenas os quadros de leitura abertos transladados são indicados para cada mRNA. Os painéis à direita mostram um padrão típico de mRNAs de EAV isolados de células infectadas, visualizados por hibridação para uma sonda complementar ao final 3' do genoma e, portanto, reconhecendo todas as espécies de mRNA viral.

[060] As **Figuras 11A a B** mostram esquematicamente a estrutura de haste-laço de RNA prevista da região de CDS 5' de mRNA de alfavírus 26S com uma topologia de pico e vale. Modelos bidimensionais (2D) de estrutura de RNA como base para os primeiros 70 a 140 nucleotídeos dos CDS a partir de sete mRNAs de Alfavírus representativos (SINV, SFV, RRV, SAGV, GETV, MIDV, UNAV, BEBV, MAYV e AURAV). As sequências foram numeradas a partir do códon de iniciação (AUGi), em que A é a posição +1. As estruturas previstas são construídas com base em dados de SHAPE (acilação e extensão de iniciador de 2'-hidroxila seletiva) (Toribio *et al.*, 2016).

[061] As **Figuras 12A a C** resumizam graficamente os resultados de experimentos *in vivo* exemplificativos realizados para demonstrar que RNAs de replicação de alfavírus modificados com um motivo de DLP incidem sobre imunogenicidade em camundongos Balb/c. Nesse experimento, animais BALB/c com 6 a 8 semanas de idade foram preparados

nos Dias 0 e 42 com o uso de doses variadas do RNA de replicação. Baços e soro foram coletados no Dia 56, e (a) citometria de fluxo para memória de célula T de HA específico ($CD8^+CD44^+CD62L^{Lo}KLRG-1^{Lo}IL-7R^H CXCR3^H$) com o uso de Dextrâmeros para detecção (H-2 Kd [IYSTVASSL; SEQ ID NO: 44]) e (b,c) IFN- γ ELISpot para quantificar respostas de efector de célula T de $CD8^+$ e $CD4^+$. Estatísticas foram feitas com o uso de comparações múltiplas entre doses correspondidas com o uso de uma análise unidirecional comum de variância (ANOVA). **Figural2A:** Um aumento significativo em células efectoras precursoras de memória (MPECs) foi observado em construtos contendo o motivo de DLP comparado a cada dose comparável de replicação não modificado. **Figural2B:** Respostas de célula T de efector foram medidas pelo número de células de HA de antígeno específico que estavam secretando IFN- γ seguindo a estimulação com um peptídeo de célula T $CD8^+$. **Figura 12C:** Respostas de célula T de efector foram medidas pelo número de células de HA de antígeno específico que estavam secretando IFN- γ seguindo a estimulação com um peptídeo de célula T $CD4^+$.

[062] **A Figura 13** sumariza graficamente os resultados de experimentos *in vivo* exemplificativos realizados para demonstrar que RNAs de replicação de alfavírus modificados com um motivo de DLP incorporado a montante da

sequência que codifica genes de proteína não estrutural impediram de modo eficaz a supressão de resposta imune mediante pré-tratamento com agentes que simulam infecção viral em camundongos Balb/c. Animais BALB/c com 6 a 8 semanas de idade foram pré-tratados com 20 µg de Poli(I:C) ou soro fisiológico administrado por meio de injeção hidrodinâmica na veia caudal 24 horas antes de vacinação para simular uma infecção viral em curso. Os camundongos foram, então, preparados no Dia 0 e reforçados no Dia 28 com o uso de uma dose de 1,5 µg de replicação de RNA que codifica HA. O soro foi coletado no Dia 42, e anticorpos de HA específico foram medido no soro. As concentrações de anticorpos no soro foram calculadas por interpolação de diluição versus densidade óptica em uma regressão logística quadriparamétrica e com o uso do anticorpo monoclonal de HA específico 8D2 como um padrão. Estatísticas entre grupos individuais foram conduzidas com o uso de um teste de Mann-Whitney (não paramétrico).

[063] **As Figuras 14A a 14C** sumarizam graficamente os resultados de experimentos *in vivo* realizados para demonstrar que os replicões contendo DLP, de acordo com a presente revelação, são compatíveis com formulações de LNP (nanopartículas lipídicas catiônicas). Nesse experimento, animais BALB/c com 6 a 8 semanas de idade foram preparados nos Dias 0 e reforçados no Dia 28 com o uso de doses variadas

de um replicação de RNA que codifica HA. Baços e soro foram coletados no Dia 42. **Figura 14A:** Anticorpos de HA específico foram medidos no soro. Título de anticorpo sérico é o inverso do EC 20% e foi calculado por interpolação de diluição versus densidade óptica em uma regressão logística quadriparmétrica. **Figura 14B:** IFN- γ ELISpot usado para quantificar respostas de efector de célula CD8+. Para detecção de células T CD8+ de antígeno específico, esplenócitos foram incubados com o peptídeo Kd H-2 (IYSTVASSL; SEQ ID NO: 44). **Figura 14C:** IFN- γ ELISpot usado para quantificar respostas de efector de célula T CD4+. Para detecção de células T CD4+ de antígeno específico, esplenócitos foram incubados com célula T CD4 restringida com H2-D epítipo KSSFERNVWLIKKN (SEQ ID NO: 45). Estatísticas entre grupos individuais foram conduzidas com o uso de um teste de Mann-Whitney (não paramétrico).

[064] **A Figura 15** ilustra graficamente uma configuração exemplificativa não limitante de mRNA contendo DLP, na qual um elemento de DLP de vírus de Sindbis é colocado a montante de uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI; dsGFP), e uma sequência de UTR 5' é colocada imediatamente a jusante de um promotor T7 e a montante da sequência de DLP de vírus de Sindbis. A sequência de codificação para dsGFP é ligada ao elemento de DLP por meio de um sinal P2A, o qual é um peptídeo de autoclivagem

autocatalítico (por exemplo, peptídeo de auto-protease) derivado do teschovírus-1 porcino. Também mostrado na porção inferior da Figura está outra configuração exemplificativa não limitante de mRNA contendo DLP, na qual uma sequência de codificação para uma forma desestabilizada de gene repórter EGFP (dsGFP) usado como um GOI é ligado de modo operável ao sinal de degradação de PEST proteolítico derivado de um camundongo gene da ornitina descarboxilase (MODC).

[065] As **Figuras 16A a D** sumarizam graficamente os resultados de experimentos realizados para demonstrar que mRNAs modificados contendo DLP pode conferir resistência ao interferon. **Figura 16A:** inclusão de DLP em mRNA resulta em um aumento significativo estatisticamente na frequência de células de GFP positivo na presença de IFN. Média com intervalos de 95% de confiança em teste de Kruskai-Wallist (não paramétrico). **Figura 16B:** mRNA não modificado é sensível a tratamento com IFN (média com intervalos de 95% de confiança em ANOVA de 2 vias. Interação: $p=0,0083$. Fila: $p<0,0001$. Coluna: $p=0,0273$. Teste de comparação múltipla de Sidak com * $p=0,0217$ e # $p<0,0241$). **Figura 16C:** mRNA modificado com DLP produz um aumento estatisticamente significativo de 30% em produção de proteína por célula comparado a mRNA não modificado na presença de IFN (média com intervalos de 95% de confiança em ANOVA de 2 vias: $p<0,0001$. Teste de comparação múltipla de Sidak com ***

$p < 0,0002$ e **** $p < 0,0001$). **Figura 16D:** mRNA modificado com DLP na presença de IFN produz uma quantidade equivalente de proteína comparado a mRNA não modificado na ausência de tratamento com IFN (média com intervalos de 95% de confiança em ANOVA de 2 vias. Interação: $p < 0,0001$. Fila: $p < 0,0001$. Coluna: $p = 0,0023$. Teste de comparação múltipla de Sidak com **** $p < 0,0001$ e ** $p < 0,0023$).

[066] O supraexposto e outros recursos da presente revelação se tornarão mais totalmente aparentes a partir da descrição a seguir e reivindicações anexas, tomadas em conjunto com os desenhos anexos. Entende-se que esses desenhos retratam apenas algumas modalidades de acordo com a revelação e não devem ser considerados limitantes de seu escopo; a revelação será descrita com especificidade e detalhes adicionais através do uso dos desenhos anexos.

Descrição detalhada da revelação

[067] A presente revelação, em geral, se refere a composições e métodos para uso na regulação de expressão de gene em células. Algumas modalidades da revelação se referem a sistemas de expressão, tais como sistemas de expressão com base viral, com potencial de expressão superior os quais são adequados para expressar moléculas heterólogas tais como, por exemplo, vacinas e polipeptídeos terapêuticos, em células recombinantes. Por exemplo, algumas modalidades da revelação se referem a moléculas de ácido nucleico contendo

um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais elementos estruturais compreende um haste-laço de RNA. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais elementos estruturais é ligado de modo operável a uma sequência de codificação de um gene de interesse. Algumas modalidades da revelação se referem a moléculas de ácido nucleico tais como construtos e vetores de transcrição e/ou expressão, contendo uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral. Também são revelados no presente documento em algumas modalidades vetores de transcrição e vetores de expressão, tais como vetores com base viral, que compreendem uma sequência de codificação de um gene de interesse. Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico da presente revelação, por exemplo, mensageiro (mRNA) e replicação de RNA, são gerados por meio de síntese de novo e/ou transcrição in vitro. Células recombinantes que são modificadas geneticamente para incluir uma ou mais das moléculas de ácido nucleico reveladas no presente documento, bem como biomateriais e produtos recombinantes derivados de tais células também estão dentro do escopo do pedido. No presente documento são fornecidos adicionalmente composições e kits que incluem uma ou mais das moléculas de ácido nucleico e/ou

células recombinantes reveladas no presente documento, bem como métodos para conferir uma resistência ao sistema imune inato em uma célula hospedeira.

[068] Na descrição detalhada a seguir, é feita referência aos desenhos anexos, que formam uma parte do presente documento. Nos desenhos, símbolos similares tipicamente identificam componentes similares, a não ser que o contexto determine de outro modo. As alternativas ilustrativas descritas na descrição detalhada, desenhos e reivindicações não se destinam a ser limitantes. Outras alternativas podem ser usadas, e outras mudanças podem ser produzidas, sem que se afaste do espírito ou escopo da matéria apresentada aqui. Será prontamente compreendido que os aspectos, como, em geral, descritos no presente documento, e ilustrados nas Figuras, podem ser dispostos, substituídos, combinados e projetados em uma ampla variedade de configurações diferentes, todas as quais são explicitamente contempladas e fazem parte do presente pedido.

[069] A menos que definido de outra forma, todos os termos da técnica, notações e outros termos ou terminologia científica usados no presente documento são destinados a ter os significados comumente compreendidos pelas pessoas versadas na técnica à qual esse pedido pertence. Em alguns casos, termos com significados compreendidos comumente são definidos no presente documento para clareza e/ou para pronta

referência, e a inclusão de tais definições no presente documento não deve necessariamente ser interpretada como representando uma diferença substancial sobre o que é, em geral, compreendido na técnica. Muitas das técnicas e procedimentos descritos ou referenciados no presente documento são bem compreendidos e comumente empregados com o uso de metodologia convencional pelas pessoas versadas na técnica.

Algumas definições

[070] As formas singulares "um", "uma", "o" e "a" incluem referências plurais a menos que o contexto determine claramente de outra forma. Por exemplo, o termo "uma célula" inclui uma ou mais células, que compreendem misturas das mesmas.

[071] O termo "cerca de", como usado no presente documento, tem seu significado comum de aproximadamente. Caso o grau de aproximação não esteja claro de outra forma a partir do contexto, "cerca de" significa dentro de mais ou menos 10% do valor fornecido, ou arredondado para a figura significativa mais próxima, em todos os casos inclusive do valor fornecido. Onde faixas são fornecidas, as mesmas são inclusivas dos valores de limite.

[072] Os termos, "células", "culturas de células", "linha de célula", "células recombinantes hospedeiras", "células receptoras" e "células hospedeiras" como usados no

presente documento, incluem as células de indivíduo primárias e qualquer progênie das mesmas, sem considerar o número de transferências. Em algumas situações, uma progênie não é exatamente idêntica à célula parental (devido a mutações deliberadas ou inadvertidas ou diferenças no ambiente); entretanto, tal progênie alterada é incluída nesses termos, desde que a progênie retenha funcionalidade igual ou substancialmente similar àquela da célula originalmente transformada.

[073] Como usado no presente documento, o termo "construto" é destinado a significar qualquer molécula de ácido nucleico recombinante tal como um cassete de expressão, plasmídeo, cosmídeo, fosmídeo, replicação viral, vetor transportador, de forma molécula de polinucleotídeo de replicação autônoma, bacteriófago, ou linear ou circular, molécula de polinucleotídeo de DNA ou RNA, de filamento único ou de filamento duplo, derivada de qualquer fonte, capaz de integração genômica ou replicação autônoma, que compreende uma molécula de ácido nucleico em que sequências de ácido nucleico são ligadas de uma maneira funcionalmente operacional, por exemplo, ligadas de modo operável.

[074] O termo "derivado de" usado no presente documento se refere a uma origem ou fonte, e pode incluir moléculas não purificadas ou purificadas, recombinantes, que ocorrem naturalmente. As moléculas da presente revelação

podem ser derivadas de moléculas virais ou não virais. Uma proteína ou polipeptídeo derivado de uma proteína ou polipeptídeo original pode incluir a proteína ou polipeptídeo original, em parte ou no todo, e pode ser um fragmento ou variante da proteína ou polipeptídeo original.

[075] O termo "gene" é usado amplamente para se referir a qualquer segmento de molécula de ácido nucleico que codifica uma proteína ou que pode ser transcrito em um RNA funcional. Genes podem incluir sequências que são transcritas, mas não são parte de uma transcrição final, madura e/ou funcional de RNA, e genes que codificam proteínas podem compreender ainda sequências que são transcritas, mas não transladadas, por exemplo, regiões não transladadas 5', regiões não transladadas 3', íntrons, etc. Ademais, genes podem, opcionalmente, compreender ainda sequências reguladoras exigidas para sua expressão, e tais sequências podem ser, por exemplo, sequências que não são transcritas ou transladadas. Genes podem ser obtidos a partir de uma variedade de fontes, que incluem clonagem a partir de uma fonte de interesse ou sintetização a partir de informações de sequência conhecidas ou previstas, e pode incluir sequências projetadas para terem parâmetros desejados.

[076] O termo "nativo" é usado no presente documento para se referir a sequências de ácido nucleico ou sequências de aminoácidos como as mesmas ocorrem naturalmente no

hospedeiro. O termo "não nativo" é usado no presente documento para se referir a sequências de ácido nucleico ou sequências de aminoácidos que não ocorrem naturalmente no hospedeiro, ou não são configuradas como as mesmas são configuradas naturalmente no hospedeiro. Uma sequência de ácidos nucleicos ou sequência de aminoácidos que tenha sido removida de uma célula hospedeira, submetida a manipulação laboratorial, e introduzida ou reintroduzida em uma célula hospedeira é considerada "não nativa". Genes sintéticos ou genes parcialmente sintéticos introduzidos em uma célula ou organismo hospedeiro são "não nativos". Genes não nativos incluem ainda genes endógenos à célula hospedeira ligada de modo operável a uma ou mais sequências reguladoras heterólogas que tenham sido recombinadas no genoma hospedeiro, ou genes endógenos à célula ou organismo hospedeiro que estão em um locus do genoma diferente daquele em que os mesmos ocorrem naturalmente.

[077] Os termos "que ocorre naturalmente" e "tipo selvagem", como usados no presente documento, se referem a uma forma encontrada na natureza. Por exemplo, uma molécula de ácido nucleico, sequência de ácidos nucleicos ou proteína que ocorre naturalmente ou tipo selvagem pode estar presente em e ser isolada de uma fonte natural, e não é modificada intencionalmente por manipulação humana. Como descrito em detalhes abaixo, as moléculas de ácido nucleico de acordo

com algumas modalidades da presente revelação são moléculas de ácido nucleico que não ocorrem naturalmente.

[078] O termo "heterólogo" quando usado em referência a um polinucleotídeo, um gene ou uma molécula de ácido nucleico se refere a um polinucleotídeo, gene ou uma molécula de ácido nucleico que não é derivada da espécie hospedeira. Por exemplo, "gene heterólogo" ou "sequência de ácidos nucleicos heterólogos" como usado no presente documento, se refere a um gene ou sequência de ácidos nucleicos de uma espécie diferente da espécie do organismo hospedeiro em que o mesmo é introduzido. Quando se refere a uma sequência reguladora de genes tal como, por exemplo, uma sequência aperfeiçoadora, ou a uma sequência de ácidos nucleicos auxiliar usada para manipular a expressão de uma sequência de gene (por exemplo, uma região não transladada 5', região não transladada 3', sequência de adição de poli A, etc.) ou a uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma domínio de proteína ou sequência de localização de proteína, "heterólogo" significa que a sequência reguladora ou auxiliar ou sequência que codifica um domínio ou sequência de localização proteína é de uma fonte diferente do gene com o qual a sequência de ácidos nucleicos reguladora ou auxiliar ou sequência de ácidos nucleicos que codifica um domínio ou sequência de localização proteína é justaposta em um genoma. Assim, um promotor ligado de modo operável a um gene ao qual

o mesmo não é ligado de modo operável em seu estado natural (por exemplo, no genoma de um organismo não geneticamente modificado) é denominado no presente documento como um "promotor heterólogo", mesmo que o promotor possa ser derivado da mesma espécie (ou, em alguns casos, o mesmo organismo) que o gene ao qual o mesmo é ligado. Por exemplo, em algumas modalidades reveladas no presente documento, uma sequência de codificação de um gene heterólogo de interesse (GOI) não é ligada à sequência de replicação de RNA recombinante em seu estado natural. Em algumas modalidades, a sequência de GOI de codificação é derivada de outro organismo, tal como outro vírus, bactéria, fungos, célula humana (tumor Ag), parasita (malária), etc.

[079] Os termos "molécula de ácido nucleico" e "polinucleotídeo" são usados de forma intercambiável no presente documento, e se referem tanto a moléculas de RNA quanto de DNA, que incluem moléculas de ácido nucleico que compreendem cDNA, DNA genômico, DNA sintético e moléculas de DNA ou RNA contendo análogos de ácido nucleico. Moléculas de ácido nucleico podem ter qualquer estrutura tridimensional. Uma molécula de ácido nucleico pode ser de filamento duplo ou de filamento único (por exemplo, um filamento senso ou um filamento antissenso). Exemplos não limitantes de moléculas de ácido nucleico incluem genes, fragmentos de gene, éxons, íntrons, RNA mensageiro (mRNA), RNA de transferência, RNA

ribossômico, siRNA, micro RNA, tracrRNAs, crRNAs, RNAs guias, ribozimas, cDNA, polinucleotídeos recombinantes, polinucleotídeos ramificados, sondas de ácido nucleico e iniciadores de ácido nucleico. Uma molécula de ácido nucleico pode conter nucleotídeos não convencionais ou modificados. Os termos "sequência de polinucleotídeos" e "sequência de ácidos nucleicos" como usados no presente documento de forma intercambiável se referem à sequência de uma molécula de polinucleotídeo. A nomenclatura para bases de nucleotídeo como estabelecido no título 37, parágrafo 1.822, do CFR é usado no presente documento. As moléculas de ácido nucleico da presente revelação podem ser sintetizadas ex vitro por qualquer meio conhecido na técnica, por exemplo, com o uso de um ou mais técnicas químicas ou enzimáticas (por exemplo, com o uso de síntese química de ácido nucleico, ou com o uso de enzimas para a replicação, polimerização, digestão exonucleolítica, digestão endonucleolítica, ligação, transcrição reversa, transcrição, modificação de base (que inclui, por exemplo, metilação), ou recombinação (que inclui recombinação homóloga e de local específico) de moléculas de ácido nucleico. Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico da presente revelação são geradas a partir de síntese de novo. Em algumas modalidades, moléculas de ácido nucleico podem ser sintetizadas de novo no todo ou em parte, com o uso de métodos químicos conhecidos, técnicas enzimáticas

conhecidas, ou qualquer combinação dos mesmos. Por exemplo, as sequências de ácido nucleico componentes podem ser sintetizadas por técnicas de fase sólida, removidas da resina, e purificadas por cromatografia líquida preparativa de alto desempenho seguida por ligação química e/ou ligação enzimática para formar uma molécula de ácido nucleico quimérica. A composição das moléculas de ácido nucleico sintéticas pode ser confirmada por análise ou sequenciamento de ácido nucleico. Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico da presente revelação podem ser montadas enzimaticamente a partir de oligonucleotídeos sintetizados quimicamente com o uso de técnicas conhecidas na técnica.

[080] Moléculas de ácido nucleico da presente revelação podem ser moléculas de ácido nucleico de qualquer comprimento, por exemplo, entre cerca de 0,5 Kb e cerca de 1.000 Kb, entre cerca de 0,5 Kb e cerca de 500 Kb, entre cerca de 1 Kb e cerca de 100 Kb, entre cerca de 2 Kb e cerca de 50 Kb, ou entre cerca de 5 Kb e cerca de 20 Kb. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico é, ou é de cerca de, 0,5 Kb, 1 Kb, 2 Kb, 3 Kb, 4 Kb, 5 Kb, 6 Kb, 7 Kb, 8 Kb, 9 Kb, 10 Kb, 15 Kb, 20 Kb, 25 Kb, 30 Kb, 40 Kb, 50 Kb, 100 Kb, 200 Kb, 500 Kb, 1 Mb, ou mais, ou uma faixa entre quaisquer dois desses valores.

[081] Os polinucleotídeos da presente revelação podem ser "biologicamente ativos" em relação a qualquer um

atributo estrutural, tal como a capacidade de um ácido nucleico para hibridizar outro ácido nucleico, ou a habilidade de uma sequência de polinucleotídeos para ser reconhecida e ligada por um ou mais dentre um fator de transcrição, um ribossoma e uma polimerase de ácido nucleico.

[082] O termo molécula de ácido nucleico "recombinante" ou "modificada" como usado no presente documento, se refere a uma molécula de ácido nucleico que foi alterada através de intervenção humana. Como exemplos não limitantes, um cDNA é uma molécula de DNA recombinante, como é qualquer molécula de ácido nucleico que tenha sido gerada por reação (ou reações) de polimerase ex vitro, ou à qual ligantes tenham sido fixados, ou que tenha sido integrada em um vetor, tal como um vetor de clonagem ou vetor de expressão. Como exemplos não limitantes, uma molécula de ácido nucleico recombinante: 1) foi sintetizada ou modificada *ex vitro*, por exemplo, com o uso de técnicas químicas ou enzimáticas (por exemplo, com o uso de síntese química de ácido nucleico, ou com o uso de enzimas para a replicação, polimerização, digestão exonucleolítica, digestão endonucleolítica, ligação, transcrição reversa, transcrição, modificação de base (que inclui, por exemplo, metilação), ou recombinação (que inclui recombinação homóloga e de local específico) de moléculas de ácido nucleico; 2) inclui sequências de nucleotídeos conjugados

que não são conjugados na natureza, 3) foi modificada com o uso de técnicas de clonagem molecular de modo que a mesma carece de um ou mais nucleotídeos em relação à sequência de moléculas de ácido nucleico que ocorre naturalmente, e/ou 4) foi manipulada com o uso de técnicas de clonagem molecular de modo que a mesma tenha uma ou mais mudanças ou rearranjos de sequência em relação à sequência de ácidos nucleicos que ocorre naturalmente. Como exemplos não limitantes, um cDNA é uma molécula de DNA recombinante, como é qualquer molécula de ácido nucleico que tenha sido gerada por reação (ou reações) de polimerase ex vitro, ou à qual ligantes tenham sido fixados, ou que tenha sido integrada em um vetor, tal como um vetor de clonagem ou vetor de expressão. Em algumas modalidades reveladas no presente documento, as moléculas de ácido nucleico recombinante do presente pedido são geradas a partir de síntese de novo.

[083] O termo "variante" de uma proteína usado no presente documento se refere a um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos que é a mesma ou essencialmente a mesma que aquela da proteína de referência exceto que tem pelo menos um aminoácido modificado, por exemplo, deletado, inserido ou substituído, respectivamente. A substituição de aminoácido pode ser uma substituição de aminoácido conservadora, preferencialmente, em um resíduo de aminoácido não essencial na proteína. Uma "substituição de aminoácido

conservadora" é uma na qual o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral similar. As famílias de resíduos de aminoácido que têm cadeias laterais similares são conhecidas na técnica. Essas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), correntes laterais polares sem carga (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Uma variante de uma proteína pode ter uma sequência de aminoácidos pelo menos cerca de 80%, 90%, 95% ou 99%, preferencialmente, pelo menos cerca de 90%, mais preferencialmente, pelo menos cerca de 95%, idêntica à sequência de aminoácidos da proteína. Preferencialmente, uma variante é uma variante funcional de uma proteína que retém a mesma função que a proteína. Os termos "variante", quando usados em referência a uma sequência de ácidos nucleicos, se referem a uma sequência de ácidos nucleicos que difere por um ou mais nucleotídeos de outra, sequência de ácido nucleotídeo usualmente

relacionada. Como tal, o termo "variante" pode se referir a uma mudança de um ou mais nucleotídeos de um ácido nucleico de referência que inclui a inserção de um ou mais novos nucleotídeos, deleção de um ou mais nucleotídeos e substituição de um ou mais nucleotídeos existentes. Uma "variação" é uma diferença entre duas sequências de nucleotídeos diferentes; tipicamente, uma sequência é uma sequência de referência. De forma ampla, o termo "variação de nucleotídeo" como usado no presente documento inclui mutação pontual, mutação múltipla, polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), deleção, inserção e translocação. O termo "ácido nucleico de referência" é usado no presente documento para descrever uma sequência de nucleotídeos que tem uma sequência de referência conhecida de interesse.

[084] Como usados no presente documento, os termos, "idêntico" ou "identidade" percentual, no contexto de dois ou mais ácidos nucleicos ou sequências de polipeptídeos, se referem a duas ou mais sequências ou subsequências que são as mesmas ou têm uma porcentagem especificada de resíduos de aminoácido ou nucleotídeos que são as mesmas, quando comparadas e alinhadas à correspondência máxima sobre uma janela de comparação. A menos que especificado de outra forma, a janela de comparação para uma sequência selecionada, por exemplo, "SEQ ID NO: X" é o comprimento inteiro de SEQ ID NO: X, e, por exemplo, a janela de comparação para "100

bp de SEQ ID NO: X" é a 100 bp indicada. O grau de aminoácido ou identidade de sequência de ácidos nucleicos pode ser determinada por vários programas de computador para alinhar as sequências a serem comparadas com base em parâmetros de programa designados. Por exemplo, sequências podem ser alinhadas e comparadas ao uso do algoritmo de homologia local de Smith & Waterman *Adv. Appl. Math.* 2:482 a 89, 1981, the homology alignment algorithm of Needleman & Wunsch *J. Mol. Biol.* 48:443 a 53, 1970, ou the search for similarity method of Pearson & Lipman *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 a 48, 1988, e podem ser alinhadas e comparadas com base em inspeção visual ou podem usar programas de computador para a análise (por exemplo, GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA no Pacote de Software de Genética de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI).

[085] Além de calcular identidade de sequência percentual, o algoritmo BLAST também realiza uma análise estatística da similaridade entre duas sequências (consultar, por exemplo, Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873 a 87, 1993). A menor probabilidade de soma ($P(N)$), fornece uma indicação da probabilidade pela qual uma correspondência entre duas sequências de nucleotídeos ou aminoácidos ocorreriam por acaso. Por exemplo, um ácido nucleico é considerado similar a uma sequência de referência caso a menor probabilidade de soma

em uma comparação do ácido nucleico de teste ao ácido nucleico de referência seja menor do que cerca de 0,1, preferencialmente, menor do que cerca de 0,01, e mais preferencialmente, menor do que cerca de 0,001.

[086] Como usado no presente documento, o termo "vetor" se refere a um construto de polinucleotídeo recombinante projetado para transferir para uma célula hospedeira, ou entre células hospedeiras, e que pode ser usado com o propósito de transformação, por exemplo, a introdução de DNA heterólogo em uma célula hospedeira. Um vetor pode ser, por exemplo, uma replicação, tal como um plasmídeo, bacteriófago, ou cosmídeo, no qual outro segmento de DNA pode ser inserido de modo a provocar a replicação do segmento inserido. De maneira geral, um vetor é capaz de replicação quando associado aos elementos de controle apropriados. O termo "vetor" inclui vetores de clonagem e vetores de expressão, bem como vetores virais e vetores de integração. Um "vetor de expressão" é um vetor que inclui uma região reguladora, desse modo, capaz de expressar sequências e fragmentos DNA, por exemplo, *ex vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Em algumas modalidades, o vetor é um plasmídeo, um vetor bacteriófago, um cosmídeo, um fosmídeo, uma replicação viral ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor eucarionte, um vetor procarionte (por exemplo, um plasmídeo bacteriano) ou um vetor transportador.

Um sistema de expressão pode ser, por exemplo, um vetor de expressão ou um cassete de expressão. Em algumas modalidades, o vetor é um vetor de transcrição. O termo "vetor de transcrição" se refere a um vetor capaz de ser transcrito, mas não transladado. Por exemplo, vetores de transcrição podem ser usados para amplificar seu inserto.

[087] Vetores de expressão de "replicação" com base em vírus podem ser usados como, por exemplo, vacinas e composições terapêuticas. Vetores de replicação podem ser utilizados em diversos formatos, que incluem DNA, RNA e partículas virais recombinantes. Um corpo amplo de literatura tem agora demonstrado eficácia de vetores de replicação virais para aplicações tais como vacinas. Além disso, esses termos podem ser denominados coletivamente como vetores, construtos de vetor ou vetores de entrega de gene.

[088] Como será compreendido por uma pessoa de habilidade comum na técnica, para quaisquer e todos os propósitos, tal como em termos de fornecer uma descrição escrita, todas as faixas reveladas no presente documento também abrangem quaisquer e todas as subfaixas e combinações de subfaixas possíveis das mesmas. Qualquer faixa listada pode ser facilmente reconhecida como descrevendo e permitindo suficientemente que a mesma faixa seja decomposta pelo menos em metades, terços, quartos, quintos, décimos iguais, etc. Como um exemplo não limitante, cada faixa

discutida no presente documento pode ser prontamente decomposta em um terço inferior, terço central e terço superior, etc. Como também será compreendido por uma pessoa versada na técnica todas as linguagens tais como "até", "pelo menos", "maior do que", "menor do que", e similares incluem o número enumerado e se referem a faixas que podem ser posteriormente decompostas em subfaixas como discutido acima. Finalmente, conforme será entendido por um especialista no assunto, uma faixa compreende cada membro individual. Assim, por exemplo, um grupo que tem 1 a 3 artigos se refere a grupos que têm 1, 2 ou 3 artigos. Similarmente, um grupo que tem 1 a 5 artigos se refere aos grupos que têm 1, 2, 3, 4 ou 5 artigos e assim por diante.

Aperfeiçoadores de capsídeo virais

[089] Alguns vírus têm sequências capazes de formar uma ou mais estruturas de haste-laço que regulam, por exemplo, aumentam, expressão de gene de capsídeo. O termo "aperfeiçoador de capsídeo viral" é usado no presente documento para se referir a um elemento regulador que compreende sequências capazes de formar tais estruturas de haste-laço. Em alguns exemplos, as estruturas de haste-laço são formadas por sequências dentro da sequência de codificação de uma proteína de capsídeo e chamada sequência de Laço a Jusante (DLP). Como revelado no presente documento, essas estruturas de haste-laço ou variantes das mesmas podem

ser usadas para regular, por exemplo, aumento de nível de expressão de genes de interesse. Por exemplo, essas estruturas de haste-laço ou variantes das mesmas podem ser usadas em um vetor recombinante (por exemplo, em um genoma viral heterólogo) para aprimorar transcrição e/ou translação de sequência de codificação ligada de modo operável a jusante das mesmas. Como um exemplo, membros do gênero Alfavírus podem resistir à ativação de proteína quinase ativada por RNA antiviral (PKR) por meio de uma estrutura de RNA proeminente presente dentro de em transcrições virais 26S, que permite uma iniciação de translação independente de eIF2 desses mRNAs. Essa estrutura, chamada de laço a jusante (DLP), está localizada a jusante do AUG em mRNA 26S SINV e em outros membros do gênero Alfavírus. No caso de vírus de Sindbis, o motivo de DLP é encontrado nos primeiros ~150 nt do RNA subgenômico de Sindbis. A forma de grampo (hairpin) está localizada a jusante do códon de iniciação de AUG de capsídeo de Sindbis (AUG é coletado em nt 50 do RNA subgenômico de Sindbis). Estudos anteriores de comparações de sequência e análise de RNA estrutural revelaram a conservação evolucionária de DLP em SINV e previram a existência de estruturas equivalentes a DLP em muitos membros do gênero Alfavírus (consultar, por exemplo, Ventoso, J. *Virol.* 9484 a 9494, Vol. 86, Setembro de 2012).

[090] PKR fosforila o fator de iniciação de

translação eucarionte 2α (eIF2 α). A fosforilação de eIF2 α bloqueia iniciação de translação de mRNA e ao fazê-lo evita que vírus conclua um ciclo de replicação produtivo. PKR é ativado por interferon e RNA de filamento duplo. Replicação de alfavírus em células hospedeiras é conhecida por induzir a proteína quinase (PKR) dependente de RNA de filamento duplo. Por exemplo, infecção de vírus de Sindbis de células induz PKR que resulta em fosforilação de eIF2 α ainda o mRNA subgenômico viral é translado de forma eficiente enquanto que a translação de todos os outros mRNAs celulares é restrita. O mRNA subgenômico de vírus de Sindbis tem um laço em forma de grampo de RNA estável localizado a jusante do códon iniciador de AUG tipo selvagem para a proteína de capsídeo de vírus (por exemplo, aperfeiçoador de capsídeo). Esse laço em forma de grampo, também chamado de estrutura de haste-laço de RNA é frequentemente denominado como a estrutura de Laço a Jusante (ou motivo de DLP). Foi relatado que a estrutura de DLP pode parar um ribossoma no AUG tipo selvagem e isso suporta translação do mRNA subgenômico sem a exigência de eIF2 α funcional. Assim, mRNAs subgenômicos de vírus de Sindbis (SINV) bem como de outros alfavírus são translados de forma eficiente mesmo em células que têm PKR altamente ativo que resulta em fosforilação completa de eIF2 α .

Estrutura de DLPs de Alfavírus

[091] A estrutura de DLP foi primeiro caracterizada em mRNA 26S de vírus de Sindbis (SINV) e também detectado em vírus da Floresta Semliki (SFV). Estruturas similares a DLP foram relatadas como estando presentes em pelo menos 14 outros membros do gênero Alfavírus que incluem membros do Novo Mundo (por exemplo, MAYV, UNAV, EEEV (NA), EEEV (SA), AURAV) e do Velho Mundo (SV, SFV, BEBV, RRV, SAG, GETV, MIDV, CHIKV e ONNV). As estruturas previstas desses mRNAs 26s de Alfavírus foram construídas com base em dados de SHAPE (acilação e extensão de iniciador de 2'-hidroxila seletiva) (Toribio *et al.*, *Nucleic Acids Res.* Maio 19; 44(9):4368 a 80, 2016), cujo conteúdo é incorporado ao presente documento a título de referência). Estruturas de haste-laço estáveis foram detectadas em todos os casos exceto para CHIKV e ONNV, enquanto que MAYV e EEEV mostraram DLPs de estabilidade inferior (consultar as **Figuras 11A a B** e Toribio *et al.*, 2016 *supra*). As atividades de DLP superiores foram relatadas para aqueles Alfavírus que continham as estruturas de DLP mais estáveis. Em alguns casos, a atividade de DLP depende da distância entre o motivo de DLP e o códon de iniciação AUG (AUGi). O espaçamento AUG-DLP em mRNAs 26s de Alfavírus é ajustado para a topologia da região ES6S do rRNA 18S ribossômico de uma forma que permita o posicionamento do AUGi no local P da subunidade 40S parada pelo DLP, que permite a incorporação de Met-tRNA sem a participação de

eIF2. Duas topologias principais foram detectadas: uma estrutura compacta e estável no clade de SFV, e uma estrutura mais estendida no grupo SINV. Em ambos os casos, foi observado que estruturas de DLP foram precedidas por uma região de reatividade de SHAPE intensa, que sugere uma conformação de filamento única para o alongamento AUG-DLP. Consequentemente, essa região mostrou um conteúdo alto de A e um conteúdo baixo de G que resultou em uma baixa propensão para formar estruturas secundárias quando comparada a posições em equivalentes todo transcriptoma de mRNA de camundongo ou em aqueles mRNAs de Alfavírus carentes de DLPs. Esses resultados relatados por Toribio *et al.* (2016, *supra*) sugerem que a ocorrência de DLPs em Alfavírus é provavelmente ligada a um achatamento da região precedente, que resulta em uma topologia de pico e vale para essa região de mRNA.

[092] No caso de vírus de Sindbis, o motivo de DLP é encontrado nos primeiros ~150 nt do RNA subgenômico de Sindbis. A forma de grampo está localizada a jusante do códon de iniciação de AUG de capsídeo de Sindbis (AUG em nt 50 do RNA subgenômico de Sindbis) e resulta em parar um ribossoma de modo que o AUG de gene de capsídeo correto é usado para iniciar translação. Isso é devido à forma de grampo fazer com que ribossomas para pausar eIF2 α não serem exigidos para suportar a iniciação de translação. Sem estar limitado por qualquer teoria em particular, acredita-se que colocar o

motivo de DLP a montante de uma sequência de codificação para qualquer GOI resulta tipicamente em uma proteína de fusão de aminoácidos de capsídeo de terminal N que são codificados na região de forma de grampo para a proteína codificada de GOI devido à iniciação ocorrer no AUG de capsídeo não no AUG de GOI. Em algumas modalidades reveladas no presente documento, uma sequência de peptídeos de teschovírus-1 2A porcino (P2A) foi modificada enquadrada imediatamente após a sequência de DLP e enquadrada imediatamente a montante de todos os GOI. A incorporação do peptídeo P2A nos replicões de RNA virais modificados da presente revelação permite liberação de uma proteína de GOI quase pura a partir da fusão capsídeo-GOI; um único resíduo de prolina é adicionado a todas as proteínas de GOI.

[093] Sem estar limitado por qualquer teoria em particular, acredita-se que o DLP permite que translação ocorra em uma maneira independente de eIF2 α , moléculas de ácido nucleico e vetores de expressão (por exemplo, vetores de replicação de RNA) modificados para usar o mesmo para iniciar translação de proteínas não estruturais têm aumentado funcionalidade em células que são ativadas por sistema imune inato. Portanto, é contemplado que moléculas de ácido nucleico modificadas por DLP e vetores de expressão (por exemplo, vetores de replicação de RNA) também funcionam com mais uniformidade em células, indivíduos ou populações

de indivíduos diferentes devido a diferenças no nível de ativação imune inata em cada um causará naturalmente variabilidade. Em algumas modalidades, o DLP pode ajudar a remover aquela variabilidade devido à translação e replicação de vetores de replicação de RNA (bem como expressão de GOI) pode ser menos impactada por respostas imunes inatas pré-existentes. Um dos valores significativos das composições e métodos revelados no presente documento é que eficácia de vacina pode ser aumentada em indivíduos que estão em um crônico ou agudo estado de ativação imune. Causas de ativação imune crônica ou aguda poderiam ser encontradas em indivíduos que sofrem de uma infecção subclínica ou clínica ou indivíduos submetidos a tratamentos médicos para câncer ou outras doenças (por exemplo, diabetes, desnutrição, pressão sanguínea alta, doença cardíaca, doença de Crohn, esclerose muscular, etc.).

[094] Como descrito no presente documento, moléculas de ácido nucleico contendo DLP (por exemplo, vetores de transcrição e expressão (por exemplo, replicões virais de RNA)) reveladas no presente documento podem ser úteis para conferir uma resistência ao sistema imune inato em um indivíduo. Replicões de RNA não modificados são sensíveis ao estado de sistema imune inato inicial de células nas quais os mesmos são introduzidos. Caso as células/indivíduos estejam em um estado de sistema imune

inato altamente ativo, o desempenho de replicação de RNA (por exemplo, replicação e expressão de um GOI) pode ser impactado negativamente. Modificando-se um DLP para controlar a iniciação de translação de proteína, particularmente de proteínas não estruturais, o impacto do estado de ativação de sistema imune inato pré-existente para influenciar replicação de replicação de RNA eficiente é removido ou reduzido. O resultado é mais uniforme e/ou expressão aprimorada de um GOI que pode impactar eficácia de vacina ou impacto terapêutico de um tratamento.

Arterivírus

[095] Os arterivírus (Família *Arteriviridae*, Gênero *Arterivírus*) abrangem um grupo importante de vírus de RNA de senso positivo, de filamento único envolto que infecta animais domésticos e silvestres. *Arterivírus* compartilham uma organização de genoma e estratégia de replicação similar àquela de membros da família *Coronaviridae* (gêneros *Coronavírus* e *Torovírus*), mas diferem consideravelmente em sua complexidade genética, comprimento de genoma, propriedades biofísicas, tamanho, arquitetura e composição de proteína estrutural das partículas virais (por exemplo, vírion). Atualmente, é considerado que o gênero *Arterivírus* inclui vírus de arterite equina (EAV), vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRSV), vírus de elevação de desidrogenase de lactato (LDV) de camundongos,

vírus da febre hemorrágica Simiana (SHFV) e vírus da doença de gambá vacilante (WPDV).

[096] Um genoma de arterivírus típico varia entre 12,7 e 15,7 kb de comprimento, mas sua organização de genoma é relativamente consistente com algumas variações menores. A organização de genoma e arquitetura de vírion exemplificativas de um arterivírus são mostradas na **Figura 10**. O genoma de arterivírus é um policistrônico +RNA, com regiões 5' e 3' não transladas (NTRs) que ladeiam uma matriz de 10 a 15 ORFs conhecidos. Os ORFs de replicase grandes 1a e 1b ocupam os três quartos proximais de 5' do genoma, sendo que o tamanho de ORF1a é muito mais variável do que aquele de ORF1b. A translação de ORF1a produz replicase poliproteína (pp) 1a, enquanto que ORF1b é expresso por deslocamento de quadro ribossômico programado -1 (PRF), que estende terminalmente C de pp1a para pp1ab. Além disso, foi relatado que um ORF transquadro curto sobrepõe a região de codificação de nsp2 de ORF1a no quadro +1 e é expresso por PRF -2. A parte de genoma proximal a 3' tem uma organização compacta e contém 8 a 12 genes relativamente pequenos, a maior parte dos quais se sobrepõe a genes circunvizinhos. Esses ORFs codificam proteínas estruturais e são expressos a partir de um conjunto aninhado de coterminais em 3' de mRNAs de sg. A organização desses ORFs é conservada, mas a jusante de ORF1b, SHFV e todos os

recentemente identificados vírus semelhantes a SHFV contém três ou quatro ORFs adicionais (~1,6 kb) que podem ser derivados de uma duplicação antiga de ORFs 2 a 4. Juntamente com a variação de tamanho em ORF1a, essa duplicação presumida explica as diferenças de tamanho de genoma entre arterivírus.

[097] Em relação a vírus de arterite equina (EAV), o genoma de EAV de tipo selvagem tem aproximadamente 12,7 Kb de tamanho. Os três quartos de 5' do genoma codificam para duas proteínas de replicase grandes 1a e 1ab; as sequências de aminoácido das duas proteínas são N-terminalmente idênticas, mas devido a um deslocamento de quadro ribossômico a sequência de aminoácidos da região terminal C de 1ab é única. O um quarto de 3' do genoma de EAV codifica para os genes de proteína estrutural do vírus, todos os quais são expressos a partir de RNAs subgenômicos. Os RNAs subgenômicos formam um conjunto aninhado de RNAs coterminais em 3' que são gerados por meio de um mecanismo transcricional descontínuo. Os RNAs subgenômicos são compostos de sequências que são não contíguas com o RNA genômico. Todos os RNAs subgenômicos de EAV compartilham uma sequência líder de 5' comum (156 a 221 nt em comprimento) que é idêntica à sequência de 5' genômica. As partes líder e corpo dos RNAs subgenômicos são conectadas por uma sequência conservada denominada uma sequência reguladora transcricional (TRS). A TRS é encontrada no final 3' do líder (TRS líder) bem como

nas regiões promotoras subgenômicas localizadas a montante de cada gene de proteína estrutural (TRS de corpo). RNAs subgenômicos são gerados conforme o RNA intermediário de replicação de filamento negativo é transcrito. Conforme a transcrição ocorre a replicação complexa pausa conforme a mesma chega a cada TRS de corpo e, então, o RNA de filamento negativo nascente se torna associado ao TRS líder de filamento positivo complementar onde a transcrição de RNA de filamento negativo continua. Esse mecanismo de transcrição descontínuo resulta em RNA subgenômico com sequências conservadas de EAV tanto de 5' quanto 3'. Os RNAs subgenômicos de filamento negativo, então, se tornam o modelo para produção do mRNA de senso positivo subgenômico.

[098] Clones de cDNA infeccioso, que representam o genoma de EAV inteiro, foram relatados e os mesmos têm sido usados para estudar replicação de RNA de EAV e transcrição por quase duas décadas. Além disso, foram gerados clones infecciosos que contém o gene cloranfenicol acetiltransferase (CAT) inserido em lugar de ORF2 e ORF7, e foi mostrado que proteína CAT se expressa em células eletroporadas com aqueles RNAs. Modificações do clone infeccioso por meio de local mutagênese dirigida e deleção das regiões de gene de proteína estrutural foram usadas para determinar a exigência para cada gene estrutural no suporte de replicação de RNA (Molenkamp 2000). O estudo relatado por

Molenkamp 2000 concluiu que não é exigido que os genes estruturais suportem replicação de RNA. Análise de exigências de homologia de sequência para atividade de TRS em produção de RNA subgenômico foi conduzida e usada para definir melhor como transcrição descontínua ocorre mecanisticamente (van Marle 1999, Pasternak 2000, Pasternak 2001, Pasternak 2003, van den Born 2005) e RNAs interferentes defeituosos foram usados para entender as sequências genômicas mínimas exigidas para replicação e empacotamento de RNA em partículas de vírus (Molenkamp 2000a).

Alfavírus

[099] Alfavírus é um gênero de vírus genética, estrutural e serologicamente relacionados da família Togaviridae do grupo IV que inclui pelo menos 30 membros, sendo que cada um tem genomas de RNA de filamento único de polaridade positiva delimitados em um nucleocapsídeo circundado por um invólucro contendo proteínas de pico viral. Atualmente, o gênero alfavírus compreende entre outros o vírus de Sindbis (SIN), o vírus da Floresta Semliki (SFV), o vírus de Ross River (RRV), vírus de encefalite equina venezuelana (VEEV), e vírus de encefalite equina oriental (EEEV), todos os quais são proximamente relacionados e são capazes de infectar vários vertebrados tais como mamíferos, roedores, peixe, espécies aviárias e mamíferos maiores tais como seres humanos e cavalos bem como invertebrados tais

como insetos. A transmissão entre espécies e indivíduos ocorre principalmente por meio de mosquitos que fazem o alfavírus um contribuinte para a coleta de Arbovírus - ou Vírus Transmitidos por Artrópodes. Em particular, os vírus Sindbis e da Floresta Semliki foram amplamente estudados e, portanto, o ciclo de vida, modo de replicação, etc., desses vírus são bem caracterizados. Em particular, foi mostrado que alfavírus se replica de forma muito eficiente em células animais o que os torna valiosos como vetores para produção de proteína e ácidos nucleicos em tais células.

[100] Partículas de alfavírus são envolvidas, têm um diâmetro de 70 nm, tendem a ser esféricas (embora levemente pleomórficas), e têm um nucleocapsídeo isométrico de aproximadamente 40 nm. A **Figura9** retrata uma estrutura genômica e expressão de genoma de alfavírus típicas. O genoma de Alfavírus é RNA de filamento único de polaridade positiva de aproximadamente 11 a 12 kb de comprimento, que compreende uma capa 5', uma cauda poli-A 3', e dois quadros de leitura abertos com um primeiro quadro que codifica as proteínas não estruturais com função enzimática e um segundo quadro que codifica as proteínas estruturais virais (por exemplo, a proteína de capsídeo C, glicoproteína E1, glicoproteína E2, proteína E3 e proteína 6K).

[101] Os dois terços de 5' do genoma de alfavírus codificam um número de proteínas não estruturais necessário

para transcrição e replicação de RNA viral. Essas proteínas são transladas diretamente a partir do RNA e juntamente com proteínas celulares formam o polimerase de RNA dependente de RNA essencial para replicação e transcrição de genoma viral de RNA subgenômico. Quatro proteínas não estruturais (nsP1-4) são produzidas como uma poliproteína única que constitui o maquinário de replicação do vírus. O processamento da poliproteína ocorre de uma maneira altamente regulada, sendo que a clivagem na junção P2/3 influencia o uso de modelo de RNA durante replicação de genoma. Esse local está localizado na base de uma fenda estreita e não é prontamente acessível. Uma vez clivado, a nsP3 cria uma estrutura de anel que circunda a nsP2. Essas duas proteínas têm uma interface extensiva. As mutações em nsP2 que produzem vírus não citopáticos ou um agrupamento de fenótipos sensíveis à temperatura na região de interface P2/P3. Mutações de P3 opostas à localização das mutações não citopáticas de nsP2 impedem clivagem eficiente de P2/3. Isso, por sua vez, pode afetar a infectividade de RNA alterando níveis de produção viral de RNA.

[102] O um terço de 3' do genoma compreende RNA subgenômico que serve como um modelo para translação de todas as proteínas estruturais exigidas para formar partículas virais: a proteína de nucleocapsídeo de núcleo C, e as proteínas de envólucro P62 e E1 que se associam como um

heterodímero. As glicoproteínas de superfície ancoradas em membrana viral são responsáveis por reconhecimento de receptor e entrada em células alvo através de fusão de membrana. O RNA subgenômico é transcrito a partir do promotor subgenômico p26S presente no final 3' da sequência de RNA que codifica a proteína nsp4. A maturação proteolítica de P62 em E2 e E3 provoca uma mudança na superfície viral. Os "picos" de glicoproteína E1, E2, e algumas vezes E3, formam em conjunto um dímero E1/E2 ou um trímero E1/E2/E3, em que E2 se estende a partir do centro para os vértices, E1 preenche o espaço entre os vértices, e E3, caso presente, está na extremidade distal do pico. Mediante exposição do vírus à acidez do endossoma, E1 se dissocia de E2 para formar um homotrímero de E1, que é necessário para a etapa de fusão para acionar as membranas celular e viral juntamente. A glicoproteína alfaviral E1 é uma proteína de fusão viral de classe II, que é diferente estruturalmente das proteínas de fusão de classe I encontradas em vírus influenza e HIV. A glicoproteína E2 funciona para interagir com o nucleocapsídeo através de seu domínio citoplásmico, enquanto seu ectodomínio é responsável por ligar um receptor celular. A maior parte dos alfavírus perdem a proteína periférica E3, enquanto em vírus Semliki a mesma permanece associada à superfície viral.

[103] Tem sido relatado que replicação alfavírus

ocorre em superfície membranosa dentro da célula hospedeira. Na primeira etapa do ciclo infeccioso, o final 5' do RNA genômico é translado para uma poliproteína (nsP1-4) com atividade de polimerase de RNA que produz um filamento complementar negativo ao RNA genômico. Em uma segunda etapa, o filamento negativo é usado como um modelo para a produção de dois RNAs, respectivamente: (1) um RNA genômico positivo correspondente ao genoma do vírus secundário que produz, por translação, outras proteínas nsp e atua como um genoma para o vírus; e (2) RNA subgenômico que codifica as proteínas estruturais do vírus que forma as partículas infecciosas. A razão RNA genômico/RNA subgenômico positiva é regulada por autoclivagem proteolítica da poliproteína para nsp 1, nsp 2, nsp 3 e nsp 4. Na prática, a expressão de gene viral ocorre em duas fases. Em uma primeira fase, há síntese principal de filamentos genômicos positivos e de filamentos negativos. Durante a segunda fase, a síntese de RNA subgenômico é virtualmente exclusiva resultando, desse modo, na produção de grande quantidade de proteína estrutural.

Imunidade inata

[104] Uma vez que ativação imune inata pode ocorrer devido a muitos estímulos diferentes, abordagens de vacina que se baseiam em replicões de RNA autoamplificantes para expressar GOI de antígeno ou terapêutico podem ser impactadas negativamente pela desativação de proteína hospedeira global

associada a fosforilação PKR de eIF2 α . Modificar replicções de RNA para funcionarem em um ambiente celular onde translação de proteína de hospedeiro é reprimida poderia proporcionar àqueles sistemas uma vantagem significativa sobre sistemas de replicação de RNA padrão.

[105] Consequentemente, os sistemas de replicação de RNA que são impactados negativamente por respostas imunes inatas, tais como sistemas derivados de alfavírus e arterivírus, podem ser mais eficazes para expressar seu GOI codificado quando modificados para conter um motivo de DLP. O motivo de DLP confere translação de mRNA eficiente em ambientes celulares em que translação de mRNA celular é inibida. Quando um DLP é ligado com translação de vetores de replicação de genes de proteína não estrutural as proteínas replicase e transcriptase são capazes de iniciar replicação funcional em ambientes celulares ativadas por PKR. Quando um DLP é ligado com translação de mRNAs subgenômicos expressão de GOI robusta é possível mesmo quando mRNA celular é restrito devido à ativação imune inata. Consequentemente, modificar replicções que contém estruturas de DLP para ajudar a acionar translação tanto de não genes de proteína estrutural quanto de mRNAs subgenômicos fornece ainda outra forma poderosa para superar ativação imune inata.

[106] Algumas modalidades da revelação se referem a estruturas de DLP que foram modificadas para suportar

translação de genes não estruturais virais de vetores de replicação derivados de dois vírus diferentes, vírus de encefalite equina venezuelana (VEEV) e vírus de arterite equina (EAV) carreando, desse modo, evasão de resposta imune inata para os sistemas. Como descrito em maiores detalhes abaixo, a incorporação das estruturas de DLP nos vetores de replicação tornou ambos resistentes a tratamento com interferon (IFN) e inesperadamente também resultou em um aumento global em potencial de expressão de GOI. A combinação de resistência a IFN e potencial de expressão de proteína superior transmitido modificando-se um DLP para os sistemas de replicação de RNA tornou os mesmos adequados para uso em indivíduos ou populações em que ativação imune inata está presente de forma aguda ou crônica.

Moléculas de Ácido Nucleico da Revelação

[107] Alguns aspectos da presente revelação se referem a moléculas de ácido nucleico, tais como moléculas de ácido nucleico sintéticas ou recombinantes, que incluem um ou mais motivos de DLP, uma sequência de codificação para um ou mais motivos de DLP ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico da revelação podem incluir uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI) ligada de modo operável ao motivo (ou motivos) de DLP e/ou a sequência de codificação para os motivos de DLP.

[108] Em um aspecto, é revelada no presente documento uma molécula de ácido nucleico, que compreende (i) uma primeira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo; e (ii) uma segunda sequência de ácidos nucleicos ligada de modo operável à primeira sequência de ácidos nucleicos, em que a segunda sequência de ácidos nucleicos compreende uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI). Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais elementos estruturais do aperfeiçoador de capsídeo viral compreende uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA. Em algumas modalidades, pelo menos uma dentre a uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA é compreendida por um motivo de DLP presente na primeira sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais elementos estruturais do aperfeiçoador de capsídeo viral não compreende qualquer haste-laço de RNA.

[109] Como descrito acima, um aperfeiçoador de capsídeo viral compreende sequências dentro das sequências não de codificação de 5' e/ou de codificação de 5' (preferencialmente, sequências da codificação 5') daquela expressão de aprimoramento (por exemplo, transcrição e/ou translação) de sequências ligadas de modo operável ao mesmo. Em algumas modalidades da presente revelação, o um ou mais

elementos estruturais do aperfeiçoador de capsídeo viral incluem uma ou duas estruturas de haste-laço de RNA do aperfeiçoador de capsídeo viral. Em algumas modalidades, o aperfeiçoador de capsídeo viral da presente revelação inclui as sequências contendo o promotor subgenômico 26S. Em algumas modalidades, o aperfeiçoador de capsídeo viral da revelação contém as sequências de codificação 5' em cerca de nucleotídeos 20 a 250, cerca de nucleotídeos 20 a 200, cerca de nucleotídeos 20 a 150, cerca de nucleotídeos 20 a 100, ou cerca de nucleotídeos 50 a 250, cerca de nucleotídeos 100 a 250, cerca de nucleotídeos 50 a 200, cerca de nucleotídeos 75 a 250, cerca de nucleotídeos 75 a 200, cerca de nucleotídeos 75 a 150, cerca de nucleotídeos 77 a 139, ou cerca de nucleotídeos 100 a 250, cerca de nucleotídeos 150 a 250, cerca de nucleotídeos 100 a 150, cerca de nucleotídeos 100 a 200 do RNA 26S viral, o que é capaz de formar uma estrutura em forma de grampo. Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral que são importantes para aprimorar a expressão de uma sequência heteróloga ligada de modo operável à mesma. Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos inclui codificar sequência para uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA de um aperfeiçoador de capsídeo viral. Em algumas modalidades, a primeira sequência

de ácidos nucleicos codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral que são importantes para aprimorar a translação de uma sequência heteróloga ligada de modo operável à mesma. Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral que são importantes para aprimorar a transcrição de uma sequência heteróloga ligada de modo operável à mesma.

[110] Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos da molécula de ácido nucleico inclui pelo menos cerca de 50, cerca de 75, cerca de 100, cerca de 150, cerca de 200, cerca de 300, ou mais nucleotídeos da sequência de codificação 5' para uma proteína de capsídeo viral. Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos da molécula de ácido nucleico inclui cerca de 50, cerca de 75, cerca de 100, cerca de 150, cerca de 200, cerca de 300, ou mais, ou uma faixa entre quaisquer dois desses valores, nucleotídeos da sequência de codificação 5' para uma proteína de capsídeo viral. Em algumas modalidades, o aperfeiçoador de capsídeo viral é derivado de um gene de capsídeo de uma espécie de alfavírus selecionada a partir do grupo que consiste em vírus de encefalite equina oriental (EEEV), vírus de encefalite equina venezuelana (VEEV), vírus Everglades (EVEV), vírus Mucambo (MUCV), vírus da floresta Semliki (SFV), vírus Pixuna (PIXV), vírus Middleburg (MIDV),

vírus da Chikungunya (CHIKV), vírus da O'Nyong-Nyong (ONNV), vírus de Ross River (RRV), vírus da floresta Barmah (BF), vírus de Getah (GET), vírus de Sagiya (SAGV), vírus de Bebaru (BEBV), vírus de Mayaro (MAYV), vírus de Una (UNAV), vírus de Sindbis (SINV), vírus de Aura (AURAV), vírus de Whataroa (WHAV), vírus de Babanki (BABV), vírus de Kyzylagach (KYZV), vírus de encefalite equina ocidental (WEEV), vírus Highland J (HJV), vírus Fort Morgan (FMV), Ndumu (NDUV) e vírus de Buggy Creek. Em algumas modalidades, o aperfeiçoador de capsídeo viral é derivado de um gene de capsídeo de uma espécie de vírus Sindbis ou uma espécie de vírus da Floresta Semliki. Em algumas modalidades particulares, o aperfeiçoador de capsídeo viral é derivado de um gene de capsídeo de uma espécie de vírus Sindbis. Além disso, uma pessoa de habilidade comum na técnica avaliará que modificações podem ser produzidas nas sequências de codificação 5' da proteína de capsídeo viral sem reduzir substancialmente suas atividades de aprimoramento. Mais informações a esse respeito podem ser encontradas em, por exemplo, Frolov *et al.*, *J. Virology* 70:1182, 1994; Frolov *et al.*, *J. Virology* 68:8111, 1994. Em algumas modalidades, pode ser vantagem que tais mutações preservem substancialmente a estrutura em forma de grampo de RNA formada pelas sequências de codificação de capsídeo 5'.

[111] Em algumas modalidades, o aperfeiçoador de

capsídeo viral revelado no presente documento não contém um ou mais, ou todos, das sequências de codificação 5' da proteína de capsídeo que estão a montante da estrutura em forma de grampo. Em algumas modalidades, o aperfeiçoador de capsídeo viral revelado no presente documento não contém todas as sequências de codificação 5' da proteína de capsídeo viral que estão a montante da estrutura em forma de grampo. Em algumas modalidades, a sequência de aperfeiçoador de capsídeo viral pode codificar toda ou parte da proteína de capsídeo. Consequentemente, em algumas modalidades reveladas no presente documento, a região de aperfeiçoador de capsídeo não codificará a proteína de capsídeo viral inteira. Em algumas modalidades, a sequência de aperfeiçoador de capsídeo viral codifica um fragmento terminal amino da proteína de capsídeo viral. Naquelas modalidades em que uma proteína de capsídeo funcional de outra forma é codificada pela sequência de aperfeiçoador de capsídeo, pode ser desejável extirpar a atividade de capsídeo auto-protease. Mutações de capsídeo que reduzem ou extirpam a atividade de auto-protease da proteína de capsídeo são conhecidas na técnica (consultar, por exemplo, WO1996/37616). Além de ou alternativamente, um ou mais dos resíduos de aminoácido na proteína de capsídeo podem ser alterados para reduzir atividade de protease de capsídeo.

[112] Como indicado acima, estudos anteriores de

comparações de sequência e análise de RNA estrutural revelaram a conservação evolucionária de motivos de DLP em muitos membros do gênero Alfavírus (consultar, por exemplo, Ventoso, 2012 *supra*). Consequentemente, em algumas modalidades adicionais, a sequência de aperfeiçoador de capsídeo viral da presente revelação pode ser de qualquer outra sequência de variante tal como, por exemplo, uma sequência sintética ou uma sequência heteróloga, que possa formar uma forma de grampo de RNA funcional ou estruturalmente equivalente a uma ou mais das estruturas de haste-laço de RNA previstas para um aperfeiçoador de capsídeo viral e que possa atuar para aperfeiçoar translação de sequências de RNA ligadas de modo operável a jusante da mesma (por exemplo, sequência de codificação para um gene de interesse). Exemplos não limitantes de estruturas de haste-laço de RNA que podem atuar como um aperfeiçoador transcricional e/ou translacional incluem aquelas mostradas nas **Figuras 11A e B. 11A-B**. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da revelação inclui um aperfeiçoador de capsídeo de alfavírus como derivado de vírus de Sindbis (SINV; NC 001547.1), vírus de Aura (AURAV; AF126284), vírus da Chikungunya (CHIKV; NC 004162), vírus da O'Nyong-Nyong (ONNV; NC 001512), vírus de Encefalite Equina Oriental (EEEV(SA); AF159559 e EEEV (NA); U01558), vírus de Mayaro (MAYV; DQ001069), vírus da Floresta Semliki (SFV; NC

003215), vírus de Ross River (RRV; DQ226993 e vírus de Sagiya (SAGV; AB032553), vírus de Getah (GETV; NC 006558), vírus de Middelburg (MIDV; EF536323), vírus de Una (UNAV; AF33948), ou vírus de Bebaru (BEBV; AF339480) como descrito em Toribio *et al.*, 2016 *supra*, cujo conteúdo é incorporado em sua totalidade ao presente documento a título de referência, ou uma variante do mesmo.

[113] Moléculas de ácido nucleico que têm um alto grau de identidade de sequência (por exemplo, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% de identidade de sequência) à sequência de codificação para um aperfeiçoador de capsídeo viral revelado no presente documento podem ser identificadas e/ou isoladas com o uso da sequência descrita no presente documento (por exemplo, SEQ ID NO: 1) ou quaisquer outras proteínas de capsídeo de alfavírus como as mesmas são conhecidas na técnica, por exemplo, com o uso das sequências de vírus de Sindbis (SINV; NC 001547.1), vírus de Aura (AURAV; AF126284), vírus da Chikungunya (CHIKV; NC 004162), vírus da O'Nyong-Nyong (ONNV; NC 001512), vírus de Encefalite Equina Oriental (EEEV(SA); AF159559 e EEEV (NA); U01558), vírus de Mayaro (MAYV; DQ001069), vírus da Floresta Semliki (SFV; NC 003215), vírus de Ross River (RRV; DQ226993 e vírus de Sagiya (SAGV; AB032553), vírus de Getah (GETV; NC 006558), vírus de

Middelburg (MIDV; EF536323), vírus de Una (UNAV; AF33948) e vírus de Bebaru (BEBV; AF339480), por análise de sequência de genoma, hibridação, e/ou PCR com iniciadores degenerados ou iniciadores de gene específico a partir de sequências identificadas no respectivo genoma de alfavírus. Por exemplo, o aperfeiçoador de capsídeo viral pode compreender, ou consistir em, um motivo de DLP de uma espécie de vírus que pertence à família Togaviridae, por exemplo, uma espécie de alfavírus ou uma espécie de rubivírus. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da revelação inclui um aperfeiçoador de capsídeo viral que tem uma sequência de ácidos nucleicos que exibe pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99%, ou 100% de identidade de sequência para a porção de CDS 5' de uma proteína de capsídeo de alfavírus. Em algumas modalidades, a porção de CDS 5' de uma proteína de capsídeo de alfavírus compreende pelo menos os primeiros 25, 50, 75, 80, 100, 150 ou 200 nucleotídeos da sequência de codificação para a proteína de capsídeo de alfavírus. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da revelação inclui um aperfeiçoador de capsídeo viral que tem uma sequência de ácidos nucleicos que exibe pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência para a

sequência de ácidos nucleicos de qualquer uma dentre as SEQ ID NOs: 1 e 46 a 52. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende um aperfeiçoador de capsídeo viral que tem uma sequência de ácidos nucleicos que exibe 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, ou uma faixa entre quaisquer dois desses valores, de identidade de sequência para a sequência de ácidos nucleicos de qualquer uma dentre as SEQ ID NOs: 1 e 46 a 52. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da revelação inclui um aperfeiçoador de capsídeo viral que tem uma sequência de ácidos nucleicos que exibe pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência para a sequência de SEQ ID NO: 1 revelada no presente documento. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da revelação inclui um aperfeiçoador de capsídeo viral que tem uma sequência de ácidos nucleicos que exibe pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência para qualquer uma das sequências descritas nas Figuras 11A a B e/ou na Figura 1A na publicação por Toribio *et al.* (2016 *supra*), cujo conteúdo é incorporado em sua totalidade ao presente documento a título de referência.

[114] Consequentemente, em algumas modalidades, a

molécula de ácido nucleico da revelação inclui um aperfeiçoador de capsídeo viral que tem uma sequência de ácidos nucleicos que exhibe pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência para a sequência de qualquer uma dentre as SEQ ID NOS: 46 a 52 reveladas no presente documento. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da revelação inclui um aperfeiçoador de capsídeo viral que tem uma sequência de ácidos nucleicos que exhibe pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência para a sequência estabelecida na SEQ ID NO: 46 revelada no presente documento. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da revelação inclui um aperfeiçoador de capsídeo viral que tem uma sequência de ácidos nucleicos que exhibe pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência para a sequência estabelecida na SEQ ID NO: 47 revelada no presente documento. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da revelação inclui um aperfeiçoador de capsídeo viral que tem uma sequência de ácidos nucleicos que exhibe pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos

97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência para a sequência estabelecida na SEQ ID NO: 48 revelada no presente documento. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da revelação inclui um aperfeiçoador de capsídeo viral que tem uma sequência de ácidos nucleicos que exibe pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência para a sequência estabelecida na SEQ ID NO: 49 revelada no presente documento. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da revelação inclui um aperfeiçoador de capsídeo viral que tem uma sequência de ácidos nucleicos que exibe pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência para a sequência estabelecida na SEQ ID NO: 50 revelada no presente documento. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da revelação inclui um aperfeiçoador de capsídeo viral que tem uma sequência de ácidos nucleicos que exibe pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência para a sequência estabelecida na SEQ ID NO: 51 revelada no presente documento. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da revelação inclui um

aperfeiçoador de capsídeo viral que tem uma sequência de ácidos nucleicos que exibe pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência para a sequência estabelecida na SEQ ID NO: 52 revelada no presente documento.

[115] Na molécula de ácido nucleico, de acordo com algumas modalidades da presente revelação, a uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA são posicionadas de modo operável a montante da sequência de codificação para o GOI da segunda sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, a uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA são posicionadas de modo operável de cerca de 1 a cerca de 50 nucleotídeos, de cerca de 10 a cerca de 75 nucleotídeos, de cerca de 30 a cerca de 100 nucleotídeos, de cerca de 40 a cerca de 150 nucleotídeos, de cerca de 50 a cerca de 200 nucleotídeos, de cerca de 60 a cerca de 250 nucleotídeos, de cerca de 100 a cerca de 300 nucleotídeos, ou de cerca de 150 a cerca de 500 nucleotídeos a montante da sequência de codificação para o GOI. Em algumas modalidades, a uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA são posicionadas de modo operável de cerca de 1, cerca de 2, cerca de 5, cerca de 10, cerca de 15, cerca de 20, cerca de 25, cerca de 30, cerca de 40, cerca de 50, cerca de 60, cerca de 70, cerca de 80, cerca de 90, cerca de 100, cerca de 200, cerca de 300,

cerca de 400, cerca de 500, ou uma faixa entre quaisquer dois desses valores, nucleotídeos a montante da sequência de codificação para o GOI. Em algumas modalidades, a uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA são posicionadas de modo operável imediatamente a montante da sequência de codificação para o GOI.

[116] Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico inclui ainda uma sequência de região 5' não transladada (UTR 5') posicionada de modo operável a montante à primeira sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, a sequência de 5' UTR é posicionada de modo operável de cerca de 1 a cerca de 50, de cerca de 10 a cerca de 75, de cerca de 30 a cerca de 100, de cerca de 40 a cerca de 150, de cerca de 50 a cerca de 200, de cerca de 60 a cerca de 250, de cerca de 100 a cerca de 300, ou de cerca de 150 a cerca de 500 nucleotídeos a montante da primeira sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, a sequência de 5' UTR é posicionada de modo operável de cerca de 1, cerca de 2, cerca de 5, cerca de 10, cerca de 15, cerca de 20, cerca de 25, cerca de 30, cerca de 40, cerca de 50, cerca de 60, cerca de 70, cerca de 80, cerca de 90, ou 100 nucleotídeos a montante da primeira sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, a sequência de 5' UTR é posicionada de modo operável imediatamente a montante da primeira sequência de ácidos nucleicos.

[117] Em algumas modalidades, a sequência de 5' UTR é posicionada de modo operável a jusante do promotor. Em algumas modalidades, a sequência de 5' UTR é posicionada de modo operável de cerca de 1 a cerca de 50, de cerca de 10 a cerca de 75, de cerca de 30 a cerca de 100, de cerca de 40 a cerca de 150, de cerca de 50 a cerca de 200, de cerca de 60 a cerca de 250, de cerca de 100 a cerca de 300, ou de cerca de 150 a cerca de 500 nucleotídeos a jusante da sequência de promotor. Em algumas modalidades, a sequência de 5' UTR é posicionada de modo operável de cerca de 1, cerca de 2, cerca de 5, cerca de 10, cerca de 15, cerca de 20, cerca de 25, cerca de 30, cerca de 40, cerca de 50, cerca de 60, cerca de 70, cerca de 80, cerca de 90, ou 100 nucleotídeos a jusante da sequência de promotor. Em algumas modalidades, a sequência de 5' UTR é posicionada de modo operável imediatamente a jusante da sequência de promotor. Em algumas modalidades, a sequência de 5' UTR é posicionada de modo operável a jusante do promotor e a montante da primeira sequência de ácidos nucleicos.

[118] Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de região não transladada 3' (3' UTR) posicionada de modo operável a jusante da segunda sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, a sequência de 3' UTR é posicionada de modo operável de cerca de 1 a cerca de 50 nucleotídeos, de cerca de 10 a cerca de

75 nucleotídeos, de cerca de 30 a cerca de 100 nucleotídeos, de cerca de 40 a cerca de 150 nucleotídeos, de cerca de 50 a cerca de 200 nucleotídeos, de cerca de 60 a cerca de 250 nucleotídeos, de cerca de 100 a cerca de 300 nucleotídeos, ou de cerca de 150 a cerca de 500 nucleotídeos a jusante da segunda sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, a sequência de 3' UTR é posicionada de modo operável de cerca de 1, cerca de 2, cerca de 5, cerca de 10, cerca de 15, cerca de 20, cerca de 25, cerca de 30, cerca de 40, cerca de 50, cerca de 60, cerca de 70, cerca de 80, cerca de 90, cerca de 100, cerca de 200, cerca de 300, cerca de 400, cerca de 500, ou uma faixa entre qualquer dois desses valores, nucleotídeos a jusante da segunda sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, a sequência de 3' UTR é posicionada de modo operável imediatamente a jusante da segunda sequência de ácidos nucleicos.

[119] Em algumas modalidades reveladas no presente documento, a sequência de codificação para o GOI é transcrita para um RNA mensageiro (mRNA) ou parte de um mRNA. Como usado no presente documento, o termo "mRNA" ou "RNA mensageiro" se refere a uma molécula de RNA de filamento único que é sintetizada durante transcrição, é complementar a um dos filamentos de DNA de filamento duplo, e serve para transmitir as informações genéticas contidas em DNA para os ribossomas para síntese de proteína. O mRNA pode ser unido, parcialmente

unido ou não unido, e pode ser mRNA eucarionte ou procarionte. Como discutido acima, moléculas de mRNA, de acordo com algumas modalidades da revelação, podem ser produzidas por meio de síntese de novo. Em algumas modalidades reveladas no presente documento, a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um polipeptídeo terapêutico, um polipeptídeo profilático, um polipeptídeo de diagnóstico, um polipeptídeo nutracêutico, uma enzima industrial, um polipeptídeo repórter ou qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um anticorpo, um antígeno, um modulador imune, uma citocina, uma enzima ou qualquer combinação dos mesmos.

[120] Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da revelação inclui ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease (por exemplo, peptídeo de autoclivagem autocatalítico), em que a sequência de codificação para a auto-protease é, opcionalmente, ligada de modo operável a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos. De maneira geral, qualquer local de clivagem proteolítica conhecido na técnica pode ser incorporado nas moléculas de ácido nucleico da revelação e pode ser, por exemplo, sequências de clivagem proteolítica que são clivadas pós-produção por uma protease. Locais de clivagem proteolítica adequados adicionais também incluem sequências

de clivagem proteolítica que podem ser clivadas seguindo a adição de uma protease externa. Como usado no presente documento o termo "auto-protease" se refere a um peptídeo de "autoclivagem" que possui atividade autoproteolítica e é capaz de clivar a si próprio a partir de uma porção química de polipeptídeo maior. Identificadas em primeiro lugar no vírus de febre aftosa (FMDV), um membro do grupo picornavírus, diversas auto-proteases foram identificadas posteriormente tal como, por exemplo, peptídeos "similares a 2A" Vírus de Rinite Equina A (E2A), teschovírus-1 porcino (P2A) e vírus Thosa asigna (T2A), e suas atividades em clivagem proteolítica se mostraram em vários sistemas eucariontes *ex vitro* e *in vivo*. Como tal, o conceito de auto-proteases é disponível para uma pessoa versada na técnica com muitos sistemas de auto-protease que ocorrem naturalmente tendo sido identificados. Sistemas de auto-protease bem estudados são, por exemplo, proteases virais, proteínas de desenvolvimento (por exemplo, HetR, proteínas Hedgehog), domínio de auto-protease RumA, UmuD, *etc.*). Exemplos não limitantes de peptídeos de auto-protease adequados para as composições e métodos da presente revelação incluem as sequências de peptídeo de teschovírus-1 2A porcino (P2A), um vírus de febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um Vírus de Rinite Equina A (ERAV) 2A (E2A), um vírus Thosa asigna 2A (T2A), um vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A),

um Vírus Flacherie 2A (BmIFV2A) ou uma combinação dos mesmos.

[121] Em algumas modalidades, a sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease é ligada de modo operável a jusante à primeira sequência de ácidos nucleicos e a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, o peptídeo de auto-protease compreende, ou consiste em, uma sequência de peptídeos selecionada a partir do grupo que consiste em teschovírus-1 2A porcino (P2A), um vírus de febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um Vírus de Rinite Equina A (ERAV) 2A (E2A), um vírus Thosea asigna 2A (T2A), um vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A), um Vírus Flacherie 2A (BmIFV2A) e uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o peptídeo de auto-protease inclui uma sequência de peptídeos de teschovírus-1 2A porcino (P2A).

[122] Uma pessoa versada na técnica avaliará que configurações diferentes da sequência de aperfeiçoador de capsídeo viral, da sequência que codifica o peptídeo de auto-protease e da sequência que codifica o gene de interesse podem ser empregadas desde que a sequência de aperfeiçoador de capsídeo aprimore a expressão da sequência de ácidos nucleicos heterólogos(s), por exemplo, uma sequência de codificação para um GOI, como comparada ao nível visto na ausência da sequência de aperfeiçoador de capsídeo. Essas sequências serão tipicamente configuradas para que o

polipeptídeo codificado pelo gene de interesse pode ser liberado a partir da protease e qualquer sequência de proteína de capsídeo após clivagem pela auto-protease.

[123] Uma lista não limitante de combinações exemplificativas de peptídeos de auto-protease descritas no presente documento (tal como P2A, F2A, E2A, T2A, BmCPV2A e BmIFV2A) com uma ou mais sequências de aperfeiçoador de capsídeo viral descritas no presente documento é fornecida nas Tabelas 1 e 2. A Tabela 1 fornece um nome abreviado para cada aperfeiçoador de capsídeo viral (por exemplo, "CE01") e um nome abreviado para cada peptídeo de auto-protease (por exemplo, "AP01"). Cada peptídeo 'X' numerado na Tabela 2 tem um peptídeo de auto-protease correspondente fornecido na Tabela 1. Igualmente, cada aperfeiçoador 'Y' numerado na Tabela 2 tem um aperfeiçoador de capsídeo viral correspondente fornecido na Tabela 1. Portanto, cada entrada "X:Y" na Tabela 2 fornece um exemplo de uma combinação de um aperfeiçoador de capsídeo viral e um peptídeo de auto-protease que pode ser usado nas moléculas, composições e métodos da presente revelação. Por exemplo, a combinação designada como "AP01:CE16" na Tabela 2 fornece uma combinação de aperfeiçoador de capsídeo viral derivado de vírus de Sindbis (SINV) e um peptídeo de auto-protease a partir de teschovírus-1 2A porcino (P2A).

Tabela 1: Aprimoradores de capsídeo viral e peptídeos

de auto-protease exemplificativos da revelação

Aprimorador de Capsídeo Viral (Y)	Peptídeo de Auto-protease (X)
Vírus de encefalite equina oriental (EEEV) (CE01)	teschovírus-1 2A (AP01) porcino (P2A)
Vírus de encefalite equina venezuelana (VEEV) (CE02)	vírus de febre aftosa (FMDV) 2A (AP02) (F2A)
Vírus Everglades (EVEV) (CE03)	Vírus de Rinite Equina A (ERAV) (AP03) 2A (E2A)
vírus Mucambo (MUCV)	Vírus Thosea (AP04) asigna 2A (T2A)
vírus da floresta Semliki (SFV) (CE04)	vírus da poliedrose citoplasmática 2A (AP05) (BmCPV2A)
Vírus Pixuna (PIXV) (CE05)	Vírus Flacherie (AP06) 2A (BmIFV2A)
vírus Middleburg (MIDV) (CE06)	
vírus da Chikungunya (CHIKV) (CE07)	
vírus da O'Nyong-Nyong (ONNV) (CE08)	
Vírus de Ross River (RRV) (CE09)	
vírus da floresta Barmah (BF) (CE10)	
Vírus de Getah (GET) (CE11)	
vírus de Sagiyama (SAGV) (CE12)	
vírus de Bebaru (BEBV) (CE13)	
vírus de Mayaro (MAYV) (CE14)	
vírus de Una (UNAV) (CE15)	

Aprimorador de Capsídeo Viral (Y)	Peptídeo de Auto-protease (X)
vírus de Sindbis (CE16)	
vírus de Aura (AURAV) (CE17)	
vírus de Whataroa (WHAV) (CE18)	
vírus de Babanki (BABV) (CE19)	
vírus de Kyzylagach (KYZV) (CE20)	
Vírus de encefalite equina ocidental (WEEV) (CE21)	
vírus Highland J (HJV) (CE22)	
vírus Fort Morgan (FMV) (CE23)	
Ndumu (NDUV) (CE24)	
alfavírus Salmonidae (SAV) (CE25)	
vírus de Buggy Creek (CE26)	

Tabela 2:

X : Y	X : Y	X : Y	X : Y	X : Y	X : Y
AP01 : CE01	AP02 : CE01	AP03 : CE01	AP04 : CE01	AP05 : CE01	AP06 : CE01
AP01 : CE02	AP02 : CE02	AP03 : CE02	AP04 : CE02	AP05 : CE02	AP06 : CE02
AP01 : CE03	AP02 : CE03	AP03 : CE03	AP04 : CE03	AP05 : CE03	AP06 : CE03
AP01 : CE04	AP02 : CE04	AP03 : CE04	AP04 : CE04	AP05 : CE04	AP06 : CE04
AP01 : CE05	AP02 : CE05	AP03 : CE05	AP04 : CE05	AP05 : CE05	AP06 : CE05
AP01 : CE06	AP02 : CE06	AP03 : CE06	AP04 : CE06	AP05 : CE06	AP06 : CE06

AP01 : CE07	AP02 : CE07	AP03 : CE07	AP04 : CE07	AP05 : CE07	AP06 : CE07
AP01 : CE08	AP02 : CE08	AP03 : CE08	AP04 : CE08	AP05 : CE08	AP06 : CE08
AP01 : CE09	AP02 : CE09	AP03 : CE09	AP04 : CE09	AP05 : CE09	AP06 : CE09
AP01 : CE10	AP02 : CE10	AP03 : CE10	AP04 : CE10	AP05 : CE10	AP06 : CE10
AP01 : CE11	AP02 : CE11	AP03 : CE11	AP04 : CE11	AP05 : CE11	AP06 : CE11
AP01 : CE12	AP02 : CE12	AP03 : CE12	AP04 : CE12	AP05 : CE12	AP06 : CE12
AP01 : CE13	AP02 : CE13	AP03 : CE13	AP04 : CE13	AP05 : CE13	AP06 : CE13
AP01 : CE14	AP02 : CE14	AP03 : CE14	AP04 : CE14	AP05 : CE14	AP06 : CE14
AP01 : CE15	AP02 : CE15	AP03 : CE15	AP04 : CE15	AP05 : CE15	AP06 : CE15
AP01 : CE16	AP02 : CE16	AP03 : CE16	AP04 : CE16	AP05 : CE16	AP06 : CE16
AP01 : CE17	AP02 : CE17	AP03 : CE17	AP04 : CE17	AP05 : CE17	AP06 : CE17
AP01 : CE18	AP02 : CE18	AP03 : CE18	AP04 : CE18	AP05 : CE18	AP06 : CE18
AP01 : CE19	AP02 : CE19	AP03 : CE19	AP04 : CE19	AP05 : CE19	AP06 : CE19
AP01 : CE20	AP02 : CE20	AP03 : CE20	AP04 : CE20	AP05 : CE20	AP06 : CE20
AP01 : CE21	AP02 : CE21	AP03 : CE21	AP04 : CE21	AP05 : CE21	AP06 : CE21
AP01 : CE22	AP02 : CE22	AP03 : CE22	AP04 : CE22	AP05 : CE22	AP06 : CE22
AP01 : CE23	AP02 : CE23	AP03 : CE23	AP04 : CE23	AP05 : CE23	AP06 : CE23
AP01 : CE24	AP02 : CE24	AP03 : CE24	AP04 : CE24	AP05 : CE24	AP06 : CE24
AP01 : CE25	AP02 : CE25	AP03 : CE25	AP04 : CE25	AP05 : CE25	AP06 : CE25
AP01 : CE26	AP02 : CE26	AP03 : CE26	AP04 : CE26	AP05 : CE26	AP06 : CE26

[124] Em um aspecto, são reveladas no presente documento moléculas de ácido nucleico inovadoras que incluem uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um replicação

de RNA viral modificado, em que o replicação de RNA viral modificado inclui uma primeira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral (por exemplo, um motivo de DLP) ou uma variante do mesmo, em que o aperfeiçoador de capsídeo viral é heterólogo ao replicação de RNA viral, e uma segunda sequência de ácidos nucleicos que codifica pelo menos uma proteína viral não estrutural ou uma porção da mesma, em que a primeira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos.

[125] Os termos "RNA de replicação" e "replicação de RNA" usado de forma intercambiável no presente documento, se referem a RNA que contém todas as informações genéticas exigidas para dirigir sua própria amplificação ou autorreplicação dentro de uma célula permissiva. Para dirigir sua própria replicação, a molécula de RNA 1) codifica polimerase, replicase, ou outras proteínas que possam interagir com proteínas virais ou derivadas de célula hospedeira, ácidos nucleicos ou ribonucleoproteínas para catalisar o processo de amplificação de RNA; e 2) conter sequências de RNA de atuação cis exigidas para replicação e transcrição do RNA codificado em replicação subgenômico. Essas sequências podem ser ligadas durante o processo de replicação para suas proteínas autocodificadas, ou proteínas derivadas

de célula não autocodificada, ácidos nucleicos ou ribonucleoproteínas, ou complexos entre quaisquer desses componentes. Em algumas modalidades da presente revelação, uma molécula de RNA de replicação viral modificado tipicamente contém os seguintes elementos ordenados: sequência (ou sequências) de RNA viral de 5' ou interferente defeituoso exigida em *cis* para replicação, codificação de sequências para proteínas não estruturais biologicamente ativas, promotor para o RNA subgenômico, sequências virais de 3' exigidas em *cis* para replicação, e um trato poliadenilato. Ademais, o termo RNA de replicação se refere, em geral, a uma molécula de polaridade positiva, ou senso de "mensagem", e o RNA de replicação pode ser de comprimento diferente daquele de qualquer vírus de RNA que ocorre naturalmente, conhecido. Em algumas modalidades da presente revelação, o RNA de replicação não contém sequências de codificação para pelo menos uma das proteínas virais estruturais. Nesses casos, as sequências que codificam genes estruturais podem ser substituídas por uma ou mais sequências heterólogas tais como, por exemplo, uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI). Em aqueles casos em que o RNA de replicação deve ser envolto em uma partícula de alfavírus recombinante, o mesmo tem que conter uma ou mais sequências, assim chamadas de sinais de empacotamento, que servem para iniciar interações com proteínas estruturais de alfavírus que levam

à formação de partícula.

[126] Como usado no presente documento, "RNA subgenômico" se refere a uma molécula de RNA de um comprimento ou tamanho que é menor do que o RNA genômico do qual o mesmo foi derivado. O RNA viral subgenômico deve ser transcrito a partir de um promotor interno, sujas sequências residem dentro do RNA genômico ou seu complemento. A transcrição de um RNA subgenômico pode ser mediada por polimerase (ou polimerases) codificada em vírus associada a proteínas codificadas em célula hospedeira, ribonucleoproteína (ou ribonucleoproteínas), ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades da presente revelação, o RNA subgenômico é produzido a partir de um RNA de replicação modificado como revelado no presente documento e codifica ou expressa um ou mais genes de interesse (GOI). Em vez do promotor subgenômico nativo, o RNA subgenômico pode ser colocado sob controle de local de entrada de ribossoma interno (IRES) derivado de vírus encefalomiocardite (EMCV), Vírus de Diarreia Viral Bovina (BVDV), poliovírus, vírus da febre aftosa (FMD), enterovírus 71 ou da hepatite C.

[127] Em algumas modalidades, a segunda sequência de ácidos nucleicos do replicação de RNA viral modificado inclui a sequência de codificação para pelo menos um, pelo menos dois, pelo menos três, ou pelo menos quatro proteínas

virais não estruturais. Em algumas modalidades, a segunda sequência de ácidos nucleicos do replicação de RNA viral modificado inclui a sequência de codificação para uma porção da pelo menos uma proteína viral não estrutural. Por exemplo, a segunda sequência de ácidos nucleicos do replicação de RNA viral modificado pode incluir cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, ou uma faixa entre quaisquer dois desses valores, da sequência de codificação para a pelo menos uma proteína viral não estrutural. Em algumas modalidades, a segunda sequência de ácidos nucleicos do replicação de RNA viral modificado pode incluir a sequência de codificação para uma porção substancial da pelo menos uma proteína viral não estrutural. Como usado no presente documento, uma "porção substancial" de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma proteína viral não estrutural compreende o suficiente da sequência de ácidos nucleicos que codifica a proteína viral não estrutural para permitir identificação putativa daquela proteína, por avaliação manual da sequência por uma pessoa versada na técnica, ou por comparação e identificação de sequência automatizada por computador com o uso de algoritmos tais como BLAST (consultar, por exemplo, em "Basic Local Alignment Search Tool"; Altschul SF *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403 a 410, 1993). Em algumas modalidades, a segunda sequência de ácidos nucleicos do replicação de RNA viral modificado pode

incluir a sequência de codificação inteira para a pelo menos uma proteína não estrutural. Em algumas modalidades, a segunda sequência de ácidos nucleicos compreende substancialmente toda a sequência de codificação para as proteínas não estruturais virais nativas.

[128] As técnicas e métodos moleculares pelas quais essas novas moléculas de ácido nucleico foram construídas e caracterizadas são descritas de forma mais completa nos Exemplos no presente documento do presente pedido. Como exemplos não limitantes, na seção de Exemplos, o vírus de encefalite equina venezuelana (VEEV) e vírus de arterite equina (EAV) foram usados para ilustrar as composições e métodos revelados no presente documento.

[129] Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico reveladas no presente documento são moléculas de ácido nucleico recombinante. Como usado no presente documento, o termo recombinante significa qualquer molécula (por exemplo, DNA, RNA, etc.), que é, ou resulta, entretanto de forma indireta, de manipulação humana de um polinucleotídeo. Como exemplos não limitantes, um cDNA é uma molécula de DNA recombinante, como é qualquer molécula de ácido nucleico que tenha sido gerada por reação (ou reações) de polimerase ex vitro, ou à qual ligantes tenham sido fixados, ou que tenha sido integrada em um vetor, tal como um vetor de clonagem ou vetor de expressão. Como exemplos

não limitantes, uma molécula de ácido nucleico recombinante:

- 1) foi sintetizada ou modificada *ex vitro*, por exemplo, com o uso de técnicas químicas ou enzimáticas (por exemplo, com o uso de síntese química de ácido nucleico, ou com o uso de enzimas para a replicação, polimerização, digestão exonucleolítica, digestão endonucleolítica, ligação, transcrição reversa, transcrição, modificação de base (que inclui, por exemplo, metilação), ou recombinação (que inclui recombinação homóloga e de local específico) de moléculas de ácido nucleico;
- 2) inclui sequências de nucleotídeos conjugados que não são conjugados na natureza;
- 3) foi modificada com o uso de técnicas de clonagem molecular de modo que a mesma carece de um ou mais nucleotídeos em relação à sequência de ácido nucleico que ocorre naturalmente, e/ou
- 4) foi manipulada com o uso de técnicas de clonagem molecular de modo que a mesma tenha uma ou mais mudanças ou rearranjos de sequência em relação à sequência de ácidos nucleicos que ocorre naturalmente.

[130] Uma molécula de ácido nucleico, que inclui uma variante de uma sequência de ácidos nucleicos que ocorre naturalmente, pode ser produzida com o uso de inúmeros métodos conhecidos para as pessoas versadas na técnica. A sequência de uma molécula de ácido nucleico pode ser modificada em relação a uma sequência que ocorre naturalmente a partir da qual a mesma é derivada com o uso de uma variedade

de técnicas que incluem, porém, sem limitação, técnicas de mutagênese clássicas e técnicas de DNA recombinante, tais como, porém, sem limitação, mutagênese de local dirigido, tratamento químico de uma molécula de ácido nucleico para induzir mutações, clivagem de enzima de restrição de um fragmento de ácido nucleico, ligação de fragmentos de ácido nucleico, amplificação de PCR e/ou mutagênese de regiões selecionadas de uma sequência de ácidos nucleicos, clonagem recombinacional e síntese química, que inclui síntese química de misturas oligonucleotídeo e ligação de grupos de mistura para "construir" uma mistura de moléculas de ácido nucleico, e combinações das mesmas. Homólogos de molécula de ácido nucleico podem ser selecionados a partir de uma mistura de moléculas de ácido nucleico modificadas por triagem para a função da proteína ou o replicação codificado pela molécula de ácido nucleico e/ou por hibridação com um gene de tipo selvagem ou fragmento do mesmo, ou por PCR com o uso de iniciadores que têm homologia a uma molécula ou sequência de ácido nucleico alvo ou de tipo selvagem.

[131] Em várias modalidades reveladas no presente documento, a molécula de ácido nucleico revelada no presente documento pode incluir um ou mais dos seguintes recursos.

[132] Em algumas modalidades, o replicação de RNA viral modificado inclui um replicação de RNA modificado derivado de uma espécie de vírus que pertence ao gênero

Alfavírus da família *Togaviridae* ou ao gênero *Arterivirus* da família *Arteriviridae*. Espécie de arterivírus adequada inclui vírus de arterite equina (EAV), vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRSV), vírus de elevação de desidrogenase de lactato (LDV), vírus da febre hemorrágica Simiana (SHFV) e vírus da doença de gambá vacilante (WPDV). Estirpes de arterivírus virulentas e avirulentas são ambas adequadas. Exemplos não limitantes de estirpes de arterivírus preferenciais incluem, porém, sem limitação, estirpe Bucyrus virulenta de EAV (VBS), LDV-Plagemann, LDV-C, PRRSV tipo 1, e PRRSV tipo 2. Estirpes de EAV preferenciais exemplificativas incluem, porém, sem limitação, EAV VB53, EAV ATCC VR-796, EAV HK25, EAV HK116, EAV ARVAC MLV, estirpe Bucyrus de EAV (Ohio), Bucyrus de EAV modificado, estirpe avirulenta CA95, Red Mile (Kentucky), 84KY-A1 (Kentucky), Wroclaw-2 (Polônia), Bibuna (Suíça), e Viena (Áustria). Exemplos preferenciais não limitantes de estirpes de PRRSV incluem PRRSV LV4.2.1, PRRSV 16244B, PRRSV HB-1(sh)/2002, PRRSV HB-2(sh)/2002, PRRSV HN1, PRRSV SD 01-08, PRRSV SD0802, PRRSV SD0803, PRRSV e VR2332. Exemplos preferenciais não limitantes de estirpes e variantes de SHFV incluem variantes de SHFV, SHFV-krtgla e -krtglb (SHFV-krtgla/b), SHFVkrtg2a/b (adesão ao GenBank nº JX473847 para JX473850), SHFV-LVR, a variante protótipo de SHFV LVR 42-0/M6941 (NC_003092); SHFV-krc1 e SHFVkrc2 a partir de Kibale

red colobus (HQ845737 e HQ845738, respectivamente). Outros exemplos não limitantes de arterivírus preferenciais incluem PRRSV-Lelystad, a estirpe tipo Europeia (tipo 1) (M96262); PRRSVVR2332, a estirpe tipo Norte Americana (tipo 2) (U87392); EAV-Bucyrus (NC_002532); EAV-s3685 (GQ903794); LDV-P, a estirpe Plagemann (U15146); e LDV-C, a estirpe neurovirulenta tipo C (L13298).

[133] Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos é posicionada a montante de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma porção ou toda a proteína não estrutural pp1ab do replicação de RNA de artevírus modificado. Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos é posicionada de modo operável dentro de uma região de cerca de 1 a 1.000 nucleotídeos a jusante do terminal 5' do replicação de RNA viral modificado. Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos é posicionada de modo operável dentro de uma região de cerca de 1 a 25, cerca de 1 a 40, cerca de 10 a 25, 10 a 50, cerca de 10 a 100, cerca de 20 a 50, cerca de 20 a 75, cerca de 25 a 100, cerca de 25 a 100 nucleotídeos a jusante do terminal 5' do replicação de RNA viral modificado. Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos é posicionada de modo operável dentro de uma região de cerca de 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300, ou mais, ou uma faixa entre quaisquer dois

desses valores, nucleotídeos a jusante do terminal 5' do replicação de RNA viral modificado. Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos é posicionada de modo operável dentro de uma região de cerca de 1 a 100, cerca de 1 a 500, cerca de 25 a 800, cerca de 50 a 900, cerca de 50 a 300, cerca de 25 a 200, cerca de 25 a 100, cerca de 50 a 400, cerca de 100 a 500, cerca de 100 a 300, cerca de 100 a 200, cerca de 200 a 500, cerca de 200 a 600, cerca de 200 a 400, cerca de 150 a 700, cerca de 150 a 400, ou cerca de 500 a 1.000 nucleotídeos a jusante do terminal 5' do replicação de RNA viral modificado.

[134] Sem estar limitado por qualquer teoria em particular, acredita-se que atividade de aprimoramento translacional de um motivo de DLP viral pode depender, em algumas modalidades, da distância entre o motivo de DLP viral e o códon de iniciação AUGi (Toribio *et al.*, 2016 *supra*). Consequentemente, em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos é posicionada de modo operável em uma região de cerca de 10 a 100 nucleotídeos a jusante do códon de iniciação AUGi do replicação de RNA viral modificado. Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos é posicionada de modo operável dentro de uma região de cerca de 10 a 75, cerca de 10 a 50, cerca de 10 a 25, 15 a 75, cerca de 15 a 50, cerca de 15 a 25, cerca de 25 a 75, cerca de 25 a 50, cerca de 25 a 100 nucleotídeos a jusante

do códon de iniciação AUGi do replicação de RNA viral modificado. Em algumas modalidades, a primeira sequência de ácidos nucleicos é posicionada de modo operável dentro de uma região de cerca de 25, 28, 31, 34, 37, 37, 40, 43, 46, 49, 50, ou uma faixa entre quaisquer dois desses valores, nucleotídeos a jusante do códon de iniciação AUGi do replicação de RNA viral modificado.

[135] Em algumas modalidades, a sequência que codifica o replicação de RNA viral modificado compreende ainda um ou mais cassetes de expressão, em que cada um dos cassetes de expressão compreende um promotor ligado de modo operável a uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI). Como usado no presente documento, o termo "cassete de expressão" se refere a um construto de material genético que contém sequências de codificação e informações reguladoras suficientes para dirigir transcrição e/ou translação apropriada das sequências de codificação em uma célula receptora, *in vivo* e/ou *ex vivo*. O cassete de expressão pode ser inserido em um vetor para direcionar para uma célula hospedeira desejada e/ou em um indivíduo. Ademais, o termo cassete de expressão pode ser usado de forma intercambiável com o termo "construto de expressão". O termo "cassete de expressão" como usado no presente documento, se refere a um construto de ácido nucleico que codifica uma proteína ou RNA funcional ligado de modo operável a elementos de controle de

expressão, tal como um promotor, e opcionalmente, qualquer uma ou uma combinação de outras sequências de ácido nucleico que afetam a transcrição ou translação do gene.

[136] O termo "ligado de modo operável", como usado no presente documento, denota uma ligação funcional entre duas ou mais sequências. Por exemplo, uma ligação operável entre um polinucleotídeo de interesse e uma sequência reguladora (por exemplo, um promotor) é ligação funcional que permite a expressão do polinucleotídeo de interesse. Nesse sentido, o termo "ligado de modo operável" se refere ao posicionamento de uma região reguladora e uma sequência de codificação a ser transcrita para que a região reguladora seja eficaz para regular transcrição ou translação da sequência de codificação de interesse. Em algumas modalidades reveladas no presente documento, o termo "ligado de modo operável" denota uma configuração na qual uma sequência reguladora é colocada em uma posição relativa apropriada para uma sequência que codifica um polipeptídeo ou RNA funcional de modo que a sequência de controle dirija ou regule a expressão ou localização celular do mRNA que codifica o polipeptídeo, o polipeptídeo e/ou o RNA funcional. Assim, um promotor está em ligação operável com uma sequência de ácidos nucleicos se o mesmo puder mediar a transcrição da sequência de ácidos nucleicos. Os elementos operacionalmente ligados podem ser contíguos ou não contíguos.

[137] As técnicas básicas para ligar de modo operável unir ou mais sequências de DNA são familiares para uma pessoa de habilidade comum na técnica, e tais métodos foram descritos em muitos livros para manipulação biológica molecular padrão (consultar, por exemplo, Maniatis *et al.*, “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*” 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; e Gibson *et al.*, *Nature Methods* 6:343 a 45, 2009).

[138] Em algumas modalidades reveladas no presente documento, as moléculas de ácido nucleico reveladas no presente documento podem incluir mais do que um cassete de expressão. Em princípio, as moléculas de ácido nucleico reveladas no presente documento podem, em geral, incluir qualquer número de cassetes de expressão. Em algumas modalidades particulares, o replicação de RNA viral modificado compreende pelo menos dois, três, quatro, cinco ou seis cassetes de expressão. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão é posicionado de modo operável a jusante de uma sequência reguladora transcricional (TRS) do replicação de RNA de artevírus modificado, em que a TRS pode ser TRS1, TRS2, TRS3, TRS4, TRS5, TRS6, TRS7 ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades particulares, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão é posicionado de modo operável a jusante do TRS7 do replicação de RNA de artevírus modificado.

[139] As moléculas de ácido nucleico como fornecidas no presente documento podem encontrar uso, por exemplo, como um vetor de expressão ou transcrição que, quando ligado de modo operável a uma sequência de ácidos nucleicos heterólogos tal como, por exemplo, uma sequência de codificação de um gene de interesse (GOI), pode afetar a expressão do GOI. Em algumas modalidades, a sequência de codificação do GOI é otimizada para expressão em um nível superior ao nível de expressão de uma sequência de referência de codificação. Em algumas modalidades, a sequência de referência de codificação é uma não otimizada por códon. Em algumas modalidades, a sequência de codificação de GOI compreende otimização de códon. Em relação a otimização de códon de sequências de ácido nucleico, degeneração do código genético fornece a possibilidade de substituir pelo menos uma base da sequência de codificação de proteína de um gene com uma base diferente sem fazer com que a sequência de aminoácidos do polipeptídeo produzido a partir do gene seja mudada. Consequentemente, as moléculas de ácido nucleico da presente revelação também podem ter uma ou mais substituições de nucleotídeo de acordo com degeneração do código genético. Referências descrevendo uso de códon são pronta e publicamente disponíveis. Em algumas modalidades adicionais da revelação, variantes de sequência de polinucleotídeos podem ser produzidas por uma variedade de motivos, por

exemplo, para otimizar expressão de códon para um hospedeiro particular (por exemplo, mudar códons no mRNA de arterivírus para aqueles preferidos por outros organismos tais como ser humano, hamster, camundongos ou macaco).

[140] Em algumas modalidades reveladas no presente documento, a sequência do GOI codifica um polipeptídeo. O tipo do polipeptídeo pode variar dependendo de pedidos específicos. Por exemplo, o polipeptídeo pode ser um polipeptídeo terapêutico, um polipeptídeo profilático, um polipeptídeo de diagnóstico, um polipeptídeo nutracêutico, uma enzima industrial, um polipeptídeo repórter ou qualquer combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o polipeptídeo é um anticorpo, um antígeno, um modulador imune, uma citocina, uma enzima ou uma combinação dos mesmos.

[141] Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico como revelado no presente documento pode compreender adicionalmente uma terceira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um segundo aperfeiçoador de capsídeo viral (por exemplo, um motivo de DLP), em que a terceira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante à sequência de codificação para o GOI. O segundo motivo de DLP pode ser o mesmo ou pode ser diferente do primeiro motivo de DLP posicionado a montante da sequência de codificação para as proteínas não estruturais. Consequentemente, em algumas

modalidades, o segundo motivo de DLP é o mesmo que o primeiro motivo de DLP posicionado a montante da sequência de codificação para as proteínas não estruturais. Em algumas modalidades, o segundo motivo de DLP é diferente a partir do primeiro motivo de DLP posicionado a montante da sequência de codificação para as proteínas não estruturais.

[142] Em algumas modalidades, a sequência que codifica o replicação de RNA viral modificado compreende ainda uma sequência de codificação para um local de clivagem proteolítica ligada de modo operável a jusante à terceira sequência de ácidos nucleicos e a montante à sequência de codificação para o GOI. De maneira geral, qualquer local de clivagem proteolítica conhecido na técnica pode ser incorporado nas moléculas de ácido nucleico da revelação e pode ser, por exemplo, sequências de clivagem proteolítica que são clivadas pós-produção por uma protease. Locais de clivagem proteolítica adequados adicionais também incluem sequências de clivagem proteolítica que podem ser clivadas seguindo a adição de uma protease externa. Em algumas modalidades, a sequência que codifica o replicação de RNA viral modificado compreende ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease ligado de modo operável a jusante à terceira sequência de ácidos nucleicos e a montante à sequência de codificação para o GOI. Em algumas modalidades, o peptídeo de auto-protease inclui uma

sequência de peptídeos selecionada a partir do grupo que consiste em teschovírus-1 2A porcino (P2A), um vírus de febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um Vírus de Rinite Equina A (ERAV) 2A (E2A), um vírus Thosea asigna 2A (T2A), um vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A), um Vírus Flacherie 2A (BmIFV2A) e uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o peptídeo de auto-protease inclui uma sequência de peptídeos de teschovírus-1 2A porcino (P2A).

[143] Uma pessoa versada na técnica avaliará que configurações diferentes da sequência de aperfeiçoador de capsídeo viral, da sequência de codificação para as proteínas não estruturais, da sequência que codifica o peptídeo de auto-protease, e da sequência que codifica o gene de interesse podem ser empregadas desde que a sequência de aperfeiçoador de capsídeo aumente a expressão da sequência (ou sequências) de ácidos nucleicos heterólogos, quando comparado ao nível visto na ausência da sequência de aperfeiçoador de capsídeo. Essas sequências serão tipicamente configuradas para que o polipeptídeo codificado pelo gene de interesse pode ser liberado a partir da protease e qualquer sequência de proteína de capsídeo após clivagem pela auto-protease.

[144] Em algumas modalidades, a sequência da molécula de ácido nucleico como revelada no presente documento inclui um replicação de RNA modificado de uma espécie

de vírus alfavírus. Em algumas modalidades, a replicação de RNA de alfavírus modificado é de um alfavírus que pertence ao grupo VEEV/EEEV, ou ao grupo SF, ou ao grupo SIN. Exemplos não limitantes de alfavírus do grupo SF incluem vírus da Floresta Semliki, vírus da O'Nyong-Nyong, vírus de Ross River, vírus de Middelburg, vírus da Chikungunya, vírus da floresta Barmah, vírus de Getah, vírus de Mayaro, vírus de Sagiyama, vírus de Bebaru e vírus de Una. Exemplos não limitantes de alfavírus do grupo SIN incluem vírus de Sindbis, vírus Girdwood S.A., Arbovírus Sul-Africano No. 86, vírus Ockelbo, vírus de Aura, vírus de Babanki, vírus de Whataroa e vírus de Kyzylagach. Exemplos não limitantes de alfavírus do grupo VEEV/EEEV incluem vírus de encefalite equina oriental (EEEV), vírus de encefalite equina venezuelana (VEEV), vírus Everglades (EVEV), vírus Mucambo (MUCV), vírus Pixuna (PIXV), vírus Middleburg (MIDV), vírus da Chikungunya (CHIKV), vírus da O'Nyong-Nyong (ONNV), vírus de Ross River (RRV), vírus da floresta Barmah (BF), vírus de Getah (GET), vírus de Sagiyama (SAGV), vírus de Bebaru (BEBV), vírus de Mayaro (MAYV) e vírus de Una (UNAV).

[145] Exemplos não limitantes de espécies de alfavírus incluem vírus de encefalite equina oriental (EEEV), vírus de encefalite equina venezuelana (VEEV), vírus Everglades (EVEV), vírus Mucambo (MUCV), vírus da floresta Semliki (SFV), vírus Pixuna (PIXV), vírus Middleburg (MIDV),

vírus da Chikungunya (CHIKV), vírus da O'Nyong-Nyong (ONNV), vírus de Ross River (RRV), vírus da floresta Barmah (BF), vírus de Getah (GET), vírus de Sagiya (SAGV), vírus de Bebaru (BEBV), vírus de Mayaro (MAYV), vírus de Una (UNAV), vírus de Sindbis (SINV), vírus de Aura (AURAV), vírus de Whataroa (WHAV), vírus de Babanki (BABV), vírus de Kyzylagach (KYZV), vírus de encefalite equina ocidental (WEEV), vírus Highland J (HJV), vírus Fort Morgan (FMV), Ndumu (NDUV) e vírus de Buggy Creek. Estirpes de alfavírus virulentas e avirulentas são ambas adequadas. Em algumas modalidades, o replicação de RNA de alfavírus modificado é de um vírus de Sindbis (SIN), um vírus da Floresta Semliki (SFV), um vírus de Ross River (RRV), um vírus de encefalite equina venezuelana (VEEV) ou um vírus de encefalite equina oriental (EEEV). Em algumas modalidades, o replicação de RNA de alfavírus modificado é de um vírus de encefalite equina venezuelana (VEEV).

[146] Em alguns casos em que a molécula de ácido nucleico como revelado no presente documento inclui um replicação de RNA modificado de uma espécie de vírus alfavírus, a primeira sequência de ácidos nucleicos é posicionada a montante de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma ou mais proteínas não estruturais nspl-4 ou uma porção da mesma do replicação de RNA de alfavírus modificado. Consequentemente, em algumas modalidades, a primeira

sequência de ácidos nucleicos é posicionada a montante de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica as proteínas não estruturais nsp1, nsp1-2, nsp1-3, nsp1-4, nsp2-4, nsp3-4, nsp2-3, nsp2, nsp3, nsp4, ou uma porção da mesma do replicação de RNA de alfavírus modificado. Em algumas modalidades, a sequência que codifica o replicação de RNA de alfavírus modificado inclui ainda um ou mais cassetes de expressão, em que cada um dos cassetes de expressão inclui um promotor ligado de modo operável a uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI). Em algumas modalidades, o replicação de RNA de alfavírus modificado compreende pelo menos dois, três, quatro, cinco ou seis cassetes de expressão. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão é ligado de modo operável a jusante de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica uma ou mais proteínas não estruturais nsp1-4 ou uma porção da mesma do replicação de RNA de alfavírus modificado. Consequentemente, em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão é ligado de modo operável a jusante de uma sequência de ácidos nucleicos que codifica as proteínas não estruturais nsp1, nsp1-2, nsp1-3, nsp1-4, nsp2-4, nsp3-4, nsp2-3, nsp2, nsp3, nsp4, ou uma porção da mesma, do replicação de RNA de alfavírus modificado.

[147] Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão compreende ainda uma

terceira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um segundo aperfeiçoador de capsídeo viral (por exemplo, um motivo de DLP), em que a terceira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante à sequência de codificação para o GOI. O segundo motivo de DLP pode ser o mesmo ou pode ser diferente do primeiro motivo de DLP posicionado a montante da sequência de codificação para pelo menos das proteínas não estruturais nspl-4 ou uma porção das mesmas. Consequentemente, em algumas modalidades, o segundo motivo de DLP é o mesmo que o primeiro motivo de DLP posicionado a montante da sequência de codificação para as proteínas não estruturais. Em algumas modalidades, o segundo motivo de DLP é diferente a partir do primeiro motivo de DLP posicionado a montante da sequência de codificação para as proteínas não estruturais.

[148] Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos da presente revelação compreende ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease ligado de modo operável a jusante à terceira sequência de ácidos nucleicos e a montante à sequência de codificação para o GOI. O peptídeo de auto-protease pode, em geral, ser qualquer peptídeo de auto-protease conhecido na técnica. Exemplos não limitantes de peptídeos de auto-protease incluem as sequências de peptídeo de teschovírus-1 2A porcino (P2A), um vírus de febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um Vírus de

Rinite Equina A (ERAV) 2A (E2A), um vírus Thosea asigna 2A (T2A), um vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A), um Vírus Flacherie 2A (BmIFV2A), e quaisquer combinações dos mesmos.

[149] Em um aspecto adicional, algumas modalidades reveladas no presente documento se referem a uma molécula de ácido nucleico que inclui uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um replicação de RNA de não alfavírus modificado, em que o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende uma primeira sequência de ácidos nucleicos que codifica um aperfeiçoador de capsídeo viral (por exemplo, um motivo de DLP). Em algumas modalidades, o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende ainda uma segunda sequência de ácidos nucleicos que codifica pelo menos uma proteína viral não estrutural ou uma porção da mesma, em que a primeira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos.

[150] Em algumas modalidades, o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease ligado de modo operável a jusante à primeira sequência de ácidos nucleicos e a montante à segunda sequência de ácidos nucleicos. Em algumas modalidades, o replicação de RNA de não alfavírus modificado inclui um replicação de RNA modificado de um vírus de RNA de filamento positivo. Em algumas modalidades, o

replicação de RNA de não alfavírus modificado inclui um replicação de RNA modificado de um vírus de RNA de filamento negativo.

[151] Exemplos não limitantes de replicões de RNA de não alfavírus modificados incluir modificação replicões de RNA de espécie de vírus que pertence à família *Togaviridae*, família *Flaviviridae*, família *Orthomyxoviridae*, família *Rhabdoviridae* ou família *Paramyxoviridae*. Consequentemente, em algumas modalidades, o replicação de RNA de não alfavírus modificado inclui um replicação de RNA modificado de um vírus de RNA de filamento negativo. Espécies de vírus de RNA de filamento negativo adequado incluem, porém, sem limitação, espécies virais das famílias *Orthomyxoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Paramyxoviridae*. Em algumas modalidades, o replicação de RNA de não alfavírus modificado inclui um replicação de RNA modificado de uma espécie de vírus de filamento positivo que pertence à família *Togaviridae* ou família *Flaviviridae*. Em algumas modalidades, o replicação de RNA de não alfavírus modificado inclui um replicação de RNA modificado de uma espécie de vírus de filamento positivo que pertence ao gênero *Arterivírus* da família *Arteriviridae*. Espécies de arterivírus adequadas incluem, porém, sem limitação, espécies de vírus de arterite equina (EAV), vírus da síndrome reprodutiva e respiratória porcina (PRRSV), vírus de elevação de desidrogenase de lactato (LDV), vírus da febre

hemorrágica Simiana (SHFV) e vírus da doença de gambá vacilante (WPDV).

[152] Em algumas modalidades, a sequência que codifica o replicação de RNA de não alfavírus modificado inclui ainda um ou mais cassetes de expressão, em que cada um dos cassetes de expressão compreende um promotor ligado de modo operável a uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI). Em algumas modalidades, o replicação de RNA de não alfavírus modificado compreende pelo menos dois, três, quatro, cinco ou seis cassetes de expressão. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão é ligado de modo operável a jusante da segunda sequência de ácidos nucleicos que codifica a pelo menos uma proteína viral não estrutural ou uma porção da mesma. Em algumas modalidades, pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão compreende ainda uma terceira sequência de ácidos nucleicos que codifica um ou mais elementos estruturais de um aperfeiçoador de capsídeo viral, em que a terceira sequência de ácidos nucleicos é ligada de modo operável a montante à sequência de codificação para o GOI. Em algumas modalidades, o replicação de RNA de não alfavírus modificado inclui ainda uma sequência de codificação para um peptídeo de auto-protease ligado de modo operável a jusante à terceira sequência de ácidos nucleicos e a montante à sequência de codificação para o GOI.

[153] Algumas modalidades da revelação se referem a uma molécula de ácido nucleico que inclui uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um replicação de RNA viral modificado que inclui na direção 5'->3' uma primeira sequência de ácidos nucleicos que codifica um aperfeiçoador de capsídeo de um vírus de Sindbis, uma segunda sequência de ácidos nucleicos que codifica um peptídeo de auto-protease, e uma terceira sequência de ácidos nucleicos que codifica todas as proteínas não estruturais virais. Algumas modalidades da revelação se referem a uma molécula de ácido nucleico que inclui uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um replicação de RNA viral modificado, em que o replicação de RNA viral modificado compreende um aperfeiçoador de capsídeo viral e em que a sequência do replicação de RNA viral modificado exibe pelo menos 80% de identidade de sequência para a sequência de pelo menos uma dentre as SEQ ID NOs: 15 a 18 e 27 a 29.

[154] São contempladas dentro do escopo da presente revelação variantes dos polinucleotídeos fornecidos no presente documento. Tais variantes podem ser de ocorrência natural, que incluem polinucleotídeos homólogos de uma espécie igual ou diferente, ou podem ser variantes não naturais, por exemplo, polinucleotídeos sintetizados com o uso de métodos de síntese química, ou gerados com o uso de técnicas de DNA recombinante. Em relação às sequências de

ácido nucleico, degeneração do código genético fornece a possibilidade de substituir pelo menos uma base da sequência de codificação de proteína de um gene com uma base diferente sem fazer com que a sequência de aminoácidos do polipeptídeo produzido a partir do gene seja mudada. Consequentemente, as moléculas de ácido nucleico da presente revelação também podem ter qualquer sequência de base que tenha sido mudada a partir de qualquer sequência de polinucleotídeos revelada no presente documento por substituição de acordo com degeneração do código genético. Referências descrevendo uso de códon são pronta e publicamente disponíveis. Em modalidades adicionais, variantes de sequência de polinucleotídeos podem ser produzidas por uma variedade de motivos, por exemplo, para otimizar expressão de códon para um hospedeiro particular (por exemplo, mudar códons no mRNA viral para aqueles preferidos por outros organismos tais como espécies de mamíferos ou peixe).

[155] Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico da presente revelação compreendem na direção 5'->3' uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um aperfeiçoador de capsídeo a partir de um vírus de Sindbis, uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um peptídeo de auto-protease, e uma sequência de ácidos nucleicos que codifica todas as proteínas não estruturais virais de um replicação de RNA viral modificado. Em algumas modalidades, a

molécula de ácido nucleico compreende na direção 5'->3' uma sequência de 5 UTR, um primeiro aperfeiçoador de capsídeo a partir de um vírus de Sindbis, um peptídeo de auto-protease, uma sequência que codifica todas as proteínas não estruturais virais de um replicação de RNA viral modificado, um ou mais cassetes de expressão, e um sequência de 3' UTR, em que pelo menos um dentre o um ou mais cassetes de expressão compreende um segundo aperfeiçoador de capsídeo a partir de um vírus de Sindbis ligado de modo operável a montante de uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI).

[156] Consequentemente, em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da presente revelação inclui uma sequência de ácidos nucleicos que codifica um replicação de RNA viral modificado, em que a sequência exibe pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, pelo menos 99% ou 100% de identidade de sequência para a sequência de pelo menos uma dentre as SEQ ID NOs: 15 a 18 e 27 a 29.

[157] Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da revelação é um vetor de expressão. Em algumas modalidades, o vetor de expressão inclui ainda uma ou mais sequências reguladoras adicionais, que podem ser um elemento regulador transcricional ou um elemento regulador translacional. Os termos "elemento regulador" e "região reguladora", como usados de forma intercambiável na presente

revelação, se referem a uma sequência de ácidos nucleicos que influencia iniciação de transcrição ou translação e taxa, e estabilidade e/ou mobilidade de um produto de transcrição ou translação. Tais elementos reguladores não precisam ser de sequências que ocorrem naturalmente. Sequências reguladoras incluem, porém, sem limitação, sequências promotoras, sequências aperfeiçoadoras, elementos de resposta, locais de reconhecimento de proteína, elementos induzíveis, sequências de ligação de proteína, regiões não transladas (UTRs) 5' e 3', locais de início transcricional, sequências de terminação, sequências de poliadenilação, íntrons e combinações dos mesmos. Em algumas modalidades, o vetor de expressão da revelação inclui ainda um ou mais dos seguintes: uma origem de replicação, uma ou mais sequências para promover integração do cassete de expressão no genoma hospedeiro, uma sequência de terminador.

[158] Em algumas modalidades, o vetor de expressão compreende pelo menos uma sequência de origem de replicação ("ORI") para replicação em uma célula. Os vetores podem de modo adicional compreender, opcionalmente, um ou mais marcadores selecionáveis sob o controle de um ou mais promotores eucariontes, um ou mais marcadores selecionáveis sob o controle de um ou mais promotores procariontes, e/ou uma ou mais sequências que mediam recombinação de uma sequência de ácidos nucleicos exógenos no genoma da célula

alvo.

[159] Uma ORI é a sequência em uma molécula de DNA na qual replicação começa. A ORI serve como uma base de montagem para a pré-replicação complexa. Dependendo da ORI, tal replicação pode prosseguir de modo unidirecional ou bidirecional. Um vetor de expressão como apresentado no presente documento pode incluir uma ORI para replicação do vetor de expressão em um hospedeiro de clonagem, tal como *E. coli* ou levedura, e/ou pode incluir uma ORI para replicação do vetor de expressão em uma célula alvo, que pode ser, por exemplo, uma célula de mamífero. A estrutura biologia de ORIs é amplamente conservada entre procariotas, eucariotas e vírus. A maior parte das ORIs possui padrões repetição de nucleotídeo simples tri-, tetra-, ou superior. A maior parte é rica em AT e contém repetições invertidas. As pessoas versadas na técnica serão familiar com as ORIs mais comuns, tais como P15A e a ORI da pUC'.

[160] O vetor de expressão também pode, em algumas modalidades, carrear um marcador selecionável. A título de exemplo, um vetor que inclui um cassete de expressão pode incluir, como um marcador selecionável, um gene que confere resistência a uma substância venenosa, tal como um antibiótico, um herbicida, ou alguma outra toxina, para que transformantes possam ser selecionados expondo-se as células ao veneno e selecionando-se aquelas células que sobrevivem

ao encontro. Em algumas modalidades, o marcador selecionável pode estar sob o controle de um promotor. Em algumas modalidades, o promotor que regula expressão do marcador selecionável pode ser condicional ou induzível. Em algumas modalidades, o promotor que regula expressão do marcador selecionável pode ser, preferencialmente, constitutivo, e pode ser, por exemplo, qualquer promotor descrito no presente documento ou outro promotor.

[161] Em algumas modalidades, o vetor de expressão é um plasmídeo, um vetor bacteriófago, um cosmídeo, um fosmídeo, um replicação viral, um vetor transportador ou uma combinação dos mesmos. Em algumas modalidades, o vetor de expressão é um replicação de RNA. Em algumas modalidades, o vetor de expressão é um vetor de expressão procarionte. Em algumas modalidades, o vetor de expressão é um vetor de expressão eucarionte. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico da revelação é produzida por meio de síntese de novo. Em algumas modalidades da revelação, síntese de novo pode ser usada para gerar uma molécula de mRNA sintética.

Células Recombinantes

[162] Em um aspecto, algumas modalidades reveladas no presente documento se referem a um método de transformar uma célula que inclui introduzir em uma célula hospedeira, tal como uma célula animal, uma molécula de ácido nucleico

como apresentado no presente documento, e selecionar ou triar por uma célula transformada. Os termos "célula hospedeira" e "célula hospedeira recombinante" são usados de forma intercambiável no presente documento. É compreendido que tais termos se referem não apenas à célula visada particular, mas também à progênie ou progênie potencial dessa célula. Devido ao fato de que certas modificações podem ocorrer em gerações sucessivas devido a mutação ou influência ambiental, tal progênie pode não ser, de fato, idêntica à célula-mãe, mas ainda estar incluída dentro do escopo do termo como usado no presente documento. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico é introduzida em uma célula hospedeira por um procedimento de eletroporação ou um procedimento biolístico.

[163] Em um aspecto relacionado, algumas modalidades se referem a células recombinantes hospedeiras, por exemplo, células recombinantes animais que incluem uma molécula de ácido nucleico descrita no presente documento. A molécula de ácido nucleico pode ser integrada de forma estável no genoma hospedeiro, ou pode ser replicação epissômica, ou presente na célula hospedeira recombinante como um vetor de expressão de minicírculo para uma expressão estável ou transiente. Consequentemente, em algumas modalidades reveladas no presente documento, a molécula de ácido nucleico é mantida e replicada na célula hospedeira

recombinante como uma unidade epissômica. Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico é integrada de forma estável no genoma da célula recombinante. Integração estável pode ser concluída com o uso de técnicas de recombinação genômica aleatória clássica ou com técnicas de edição de genoma mais precisas tais como com o uso de CRISPR/Cas9 dirigido por guia de RNA, ou NgAgo (*Natronobacterium gregoryi* Argonaute) de edição de genoma de endonuclease guiada por DNA, ou edição de genoma por TALEN (nucleases de efetores semelhantes a ativador de transcrição). Em algumas modalidades, a molécula de ácido nucleico presente na célula hospedeira recombinante como um vetor de expressão de para uma expressão estável ou transiente.

[164] Em algumas modalidades, células hospedeiras podem ser geneticamente modificadas (por exemplo, transduzidas ou transformadas ou transfectadas) com, por exemplo, um construto de vetor do presente pedido que pode ser, por exemplo, um vetor para recombinação homóloga que inclui sequências de ácido nucleico homólogas a uma porção do genoma da célula hospedeira, ou pode ser um vetor de expressão para a expressão de qualquer um ou uma combinação dos genes de interesse. O vetor pode ser, por exemplo, na forma de um plasmídeo, uma partícula viral, um fago, etc. Em algumas modalidades, um vetor para expressão de um

polipeptídeo de interesse também pode ser projetado para integração no hospedeiro, por exemplo, por recombinação homóloga. O vetor contendo uma sequência de polinucleotídeos como descrito no presente documento, por exemplo, molécula de ácido nucleico que compreende um genoma de alfavírus modificado ou RNA de replicação, bem como, opcionalmente, um marcador selecionável ou gene repórter, pode ser empregado para transformar uma célula hospedeira apropriada.

[165] Os métodos e composições revelados no presente documento podem ser implantados para engenharia genética de qualquer espécie, que inclui, porém, sem limitação, espécies procarionte e eucarionte. Células hospedeiras adequadas para serem modificadas com o uso das composições e métodos, de acordo com a presente revelação, podem incluir, porém, sem limitação, células de algas, células bacterianas, heterocontes, células fúngicas, células quitrídias, microfungos, microalgas e células animais. Em algumas modalidades, as células animais são células de animais invertebrados. Em algumas modalidades, as células de animais vertebrados são células de mamíferos. Células hospedeiras podem ser células não transformadas ou células que já tenham sido transfectadas com pelo menos uma molécula de ácido nucleico.

[166] Os métodos e composições revelados no presente documento podem ser usados, por exemplo, com células

visadas e/ou hospedeiras que são importantes ou interessantes para aquicultura, agricultura, criação animal, e/ou para aplicações terapêutico e médica, que incluem produção de polipeptídeos usados na fabricação de vacinas, produtos farmacêuticos, produtos industriais, produtos químicos e similares. Em algumas modalidades, as composições e métodos revelados no presente documento podem ser usados com células hospedeiras de espécie que são hospedeiros naturais de alfavírus, tais como roedores, camundongos, peixe, aves e mamíferos maiores tais como seres humanos, cavalos, porco, macaco e símios bem como invertebrados. São espécies particularmente preferenciais, em algumas modalidades do pedido, espécies animais vertebradas e espécies animais invertebradas. Em princípio, qualquer espécie animal pode ser, em geral, usada e pode ser, por exemplo, ser humano, cachorro, ave, peixe, cavalo, porco, primata, camundongo, sigmodon, furão, gado, suíno, ovelhas, coelho, gato, cabra, burro, hamster ou búfalo. Exemplos não limitantes de espécie de ave adequada incluem galinha, pato, ganso, peru, avestruz, ema, cisne, pavão, faisão, perdiz e galinha d'angola. Em algumas modalidades particulares, o peixe é qualquer espécie na família Salmonidae. Células de mamíferos primárias e tipos de células contínuas/imortalizadas também são adequadas. Exemplos não limitantes de células hospedeiras de animais adequadas

incluem, porém, sem limitação, célula endotelial de artéria pulmonar equina, célula de derme equina, célula de rim de hamster bebê (BHK), célula de rim de coelho, célula de músculo de camundongo, célula de tecido conjuntivo de camundongo, célula de colo de útero humano, ser células de laringe epidermoide humana, célula de ovário de hamster chinês (CHO), célula HEK-293 humana, célula 3T3 de camundongo, célula Vero, Célula epitelial de rim canino de Madin-Darby (MDCK), célula primária de fibroblastos de galinha, uma célula HuT78, célula de pulmão A549, célula HeLa, célula PER.C6®, célula WI-38, célula MRC-5, FRhL-2, e célula T CEM. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é célula de rim de hamster bebê. Em algumas modalidades, a célula de rim de hamster bebê é uma célula BHK-21.

[167] Técnicas para transformar uma ampla variedade das células e espécies hospedeiras mencionadas acima são conhecidas na técnica e descritas na literatura técnica e científica. Consequentemente, culturas de células que incluem pelo menos uma célula recombinante como revelado no presente documento também estão dentro do escopo desse pedido. Métodos e sistemas adequados para gerar e manter culturas de células são conhecidas na técnica.

Sequências de Ácido Nucleico Heterólogo

[168] De acordo com algumas modalidades da presente revelação, uma ampla variedade de sequências de ácido

nucleico pode ser carregada pelas moléculas de ácido nucleico da presente revelação. Em algumas modalidades, moléculas de ácido nucleico como descrito no presente documento não contêm qualquer sequência adicional de ácidos nucleicos heterólogos. Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico da presente revelação contêm uma ou mais sequências de ácido nucleico heterólogo ou exógeno adicionais. Em algumas modalidades, a uma ou mais sequências de ácido nucleico heterólogo ou exógeno adicionais incluem uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI). Em algumas modalidades reveladas no presente documento, a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo ou um RNA funcional. Em algumas modalidades, a sequência de codificação para o GOI codifica um RNA funcional selecionado a partir de um RNA ribossômico, um tRNA, um ribozima, um RNA transativante (tr) de um sistema CRISPR, um RNA crispr (cr) de um sistema CRISPR, um RNA guia quimérico de um sistema CRISPR, um micro RNA, uma molécula de RNA interferente (RNAi), um RNA de forma de grampo curto (sh), ou uma molécula de RNA de antissenso. Em algumas modalidades, a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo selecionado a partir do grupo que consiste em um polipeptídeo terapêutico, um polipeptídeo profilático, um polipeptídeo de diagnóstico, um polipeptídeo nutracêutico, uma enzima industrial, um polipeptídeo repórter ou qualquer combinação

dos mesmos. Em algumas modalidades, a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo que é selecionado a partir do grupo que consiste em um anticorpo, um antígeno, um modulador imune e uma citocina.

[169] Em algumas modalidades, a sequência de ácidos nucleicos heterólogos compreende uma sequência de ácidos nucleicos heterólogos de pelo menos cerca de 100 bases, 2 kb, 3,5 kb, 5 kb, 7 kb ou 8 kb. O RNA heterólogo ou sequência de ácidos nucleicos heterólogos pode ser escolhido a partir de uma ampla variedade de sequências derivadas de vírus, procariotas ou eucariotas. Exemplos de categorias de sequências heterólogas incluem, porém, sem limitação, imunógenos (que incluem proteínas antigênicas nativas, modificadas ou sintéticas, peptídeos, epítomos ou fragmentos imunogênicos), citocinas, toxinas, proteínas terapêuticas, enzimas, sequências antissenso e moduladores de resposta imune.

[170] Uma resposta imune ampla variedade de GOI pode ser incluída nas moléculas de ácido nucleico da presente revelação para expressar um polipeptídeo do GOI, que inclui porém, sem limitação, citocinas, toxinas, pró-fármacos, antígenos que estimulam uma resposta imune, ribozimas, e proteínas que auxiliam ou inibem uma resposta imune, bem como sequências antissenso (ou sequências senso para "aplicações antissenso"). Como observado acima, dentro de

várias modalidades da revelação o replicação de RNA modificado apresentado no presente documento pode conter a região de codificação de (e expressar, em algumas modalidades) dois ou mais polipeptídeos de interesse.

1) Citocinas

[171] Em algumas modalidades reveladas no presente documento, o GOI codifica uma citocina. De maneira geral, citocinas atuam para proliferar, ativar e/ou diferenciar células efectoras imunes. Exemplos de citocinas incluem, porém, sem limitação, macrófagos, B linfócitos, linfócitos T, células endoteliais, fibroblastos, linfocinas como interferon gama, fator de necrose de tumor, interleucina, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL- 1, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, GM-CSF, CSF-1 e G-CSF.

[172] Em algumas modalidades relacionadas, o GOI codifica um cofator imunomodulador. Como utilizados dentro do contexto da presente revelação, "cofator imunomodulador" se refere a fatores que, quando fabricados por uma ou mais das células envolvidas em uma resposta imune, ou quando adicionados de forma exógena às células, faz com que a resposta imune seja diferente em qualidade ou potência daquela que teria ocorrido na ausência do cofator. A qualidade ou potência de uma resposta pode ser medida por uma variedade de ensaios conhecidos por uma pessoa versada na técnica que incluem, por exemplo, ensaios *ex vitro* que

medem proliferação celular (por exemplo, absorção de timidina 3 H), e ensaios citotóxicos *ex vitro* (por exemplo, que medem liberação de Cr 51) (consultar *Warner et al.*, AIDS Res. and Human Retroviruses 7:645 a 655, 1991).

[173] Exemplos de cofatores imunomoduladores incluem, porém, sem limitações, interferon alfa, interferons gama, G-CSF, GM-CSF, TNFs, Interleucina-2 (IL-2), IL-4, IL-6, IL-12, IL-15, ICAM-1, ICAM-2, LFA-1, LFA-3, moléculas MHC classe I, moléculas MHC classe II, 2-microglobulina, chaperonas, CD3, B7/BB 1, proteínas transportadoras ligadas a MHC e análogos dos mesmos.

[174] A escolha de qual cofator imunomodulador incluir dentro das moléculas de ácido nucleico da presente revelação pode ser com base em efeitos terapêuticos conhecidos do cofator, ou determinados experimentalmente. Por exemplo, em infecções de hepatite B crônica tem sido constatado que interferon alfa é eficaz para compensar um déficit imunológico do paciente e, desse modo, auxiliar na recuperação da doença. Em algumas situações, um cofator imunomodulador adequado pode ser determinado experimentalmente. Resumidamente, amostras de sangue são obtidas em primeiro lugar de pacientes com uma doença hepática. Linfócitos de sangue periféricos (PBLs) são reestimulados *ex vitro* com células autólogas ou de HLA correspondido (por exemplo, células EBV transformadas), e

transduzidos com genoma de arterivírus modificado ou RNA de replicação da presente revelação que dirige a expressão de uma porção imunogênica de um antígeno de hepatite e o cofator imunomodulador. PBLs estimulados são usados como efetores em um ensaio CTL com as células transduzidas de BLA correspondido como alvos. Um aumento em resposta CTL sobre aquele visto no mesmo ensaio realizado com o uso de estimulador de HLA correspondido e células alvo transduzidas com um vetor que codifica o antígeno isoladamente, indica um cofator imunomodulador útil. Em algumas modalidades, o cofator imunomodulador interferon gama é particularmente preferencial.

[175] Outro exemplo não limitante de um cofator imunomodulador é o fator coestimulador B7/BB1. A ativação da atividade funcional completa de células T exige dois sinais. Um sinal é fornecido por interação do receptor de célula T de antígeno específico com peptídeos que são ligados a moléculas complexas de histocompatibilidade principal (MHC), e o segundo sinal, denominado como coestimulação, é entregue para a célula T por células que apresentam antígeno. O segundo sinal é exigido para produção de interleucina-2 (IL-2) por células T e parece envolver interação da molécula B7/BB 1 em células que apresentam antígeno com receptores CD28 e CTLA-4 em linfócitos T. Em algumas modalidades, B7/BB 1 pode ser introduzido em células de tumor a fim de provocar

coestimulação de células CD8+T, de modo que as células CD8+T produzam IL-2 suficiente para se expandir e se tornar totalmente ativado. Essas células CD8+T podem matar células de tumor que não estão expressando B7 devido à coestimulação não ser mais exigida para função CTL adicional. Vetores que expressam tanto o fator B7/BB1 coestimulador e, por exemplo, uma proteína de núcleo HBV imunogênico, podem ser construídos utilizando métodos que são descritos no presente documento. As células transduzidas com esses vetores se tornarão células mais eficazes que apresentam antígeno. A resposta de CTL específica do núcleo HBV será aumentada a partir da célula CD8+T totalmente ativada por meio do ligando coestimulador B7/BB 1.

2) Toxinas

[176] Em algumas modalidades reveladas no presente documento, o GOI codifica uma toxina. Em algumas modalidades, toxinas atuam para inibir diretamente o crescimento de uma célula. Exemplos de toxinas incluem, porém, sem limitação, ricina, abrina, toxina de difteria, toxina de cólera, gelonina, pokeweed, proteína antiviral, tritina, toxina Shigella, exotoxina Pseudomonas A, quinase timidina de vírus simplex de herpes (HSVTK), e fosforribosil guanina transferase de *E. coli*..

3) Pró-fármacos

[177] Em algumas modalidades reveladas no presente

documento, o GOI codifica um "pró-fármaco". Como utilizado dentro do contexto da presente revelação, "pró-fármaco" se refere a um produto de gene que ativa um composto com pouca ou nenhuma citotoxicidade em um produto tóxico. Exemplos representativos de tais produtos de gene incluem HSVTK e VZVTK (bem como análogos e derivados dos mesmos), que monofosforilam seletivamente certos arabinosídeos purinas e compostos de pirimidina substituída, que convertem os mesmos para metabólitos citotóxicos ou citostáticos. Mais especificamente, exposição dos fármacos ganciclovir, aciclovir ou qualquer de seus análogos (por exemplo, FIAU, FIAC e DHPG) a HSVTK fosforila o fármaco para sua forma trifosfato nucleotídeo ativo correspondente.

[178] Exemplos não limitantes de pró-fármacos que podem ser utilizados dentro do contexto da presente revelação incluem: fosforribosil guanina transferase de *E. coli*. que converte tioxantina em monofosfato de tioxantina tóxica; fosfatase alcalina, que converterá compostos fosforilados inativos, tais como fosfato de mitomicina e fosfato de doxorubicina para compostos desfosforilados tóxicos; fúngica (por exemplo, *Fusarium oxysporum*) e citosina deaminase bacteriana, que pode converter 5-fluorocitosina para o composto tóxico 5-fluorouracil; carboxipeptidase G2, que clivará o ácido glutâmico de para ácido N-bis (2-cloroetil) aminobenzoil glutâmico criando, desse modo, uma

mostarda de ácido benzóico tóxica; e Penicilina-V amidase, que converterá derivados fenoxiacetabida de doxorubicina e melfalano para compostos tóxicos.

4) Sequência Antissenso

[179] Em algumas modalidades reveladas no presente documento, a sequência de codificação para o GOI é uma sequência antissenso. Sequências antissenso são projetadas para ligarem-se a transcrições de RNA, e desse modo, impedir síntese celular de uma proteína particular ou impedir o uso daquela sequência de RNA pela célula. Exemplos não limitantes de tais sequências incluem timidina quinase antissenso, di-hidrofolato redutase antissenso, HER2 antissenso, ABL antissenso, Myc antissenso, ras antissenso, bem como sequências antissenso que bloqueiam qualquer uma das enzimas na via biossintética de nucleotídeo. Além disso, de acordo com algumas modalidades reveladas no presente documento, sequências antissenso para interferon e 2 microglobulina podem ser utilizadas a fim de diminuir resposta imune.

[180] Em algumas modalidades, antissenso RNA pode ser utilizado como um agente antitumoral a fim de induzir uma resposta restrita de Classe I potente. Além de ligar RNA e, desse modo, impedir translação de um mRNA específico, acredita-se que níveis altos de sequências antissenso específicas induzem a expressão aumentada de interferons (que incluem gama-interferon) devido à formação de grandes

quantidades de RNA de filamento duplo. A expressão aumentada de interferon gama, por sua vez, reforça a expressão de antígenos MHC Classe I. Sequências antissenso preferencias para uso a esse respeito incluem RNA actina, RNA miosina e RNA histona. RNA antissenso que forma uma incompatibilidade com RNA actina é particularmente preferencial.

5) Ribozimas

[181] Em algumas modalidades reveladas no presente documento, são fornecidas moléculas de ácido nucleico que compreendem uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA que produzem ribozimas mediante infecção de uma célula hospedeira. Ribozimas são usadas para clivar RNAs específicos e são projetadas de modo que possam afetar apenas uma sequência de RNA específica. De maneira geral, a sequência de ligação de substrato de uma ribozima tem entre 10 e 20 nucleotídeos de comprimento. O comprimento dessa sequência é suficiente para permitir uma hibridação com RNA alvo e desassociação da ribozima a partir do RNA clivado. Exemplos representativos para criar ribozimas incluem aqueles descritos nas Patentes nºs U.S. 5.116.742; 5.225.337 e 5.246.921.

6) Proteínas e Outros Constituintes Celulares

[182] Em algumas modalidades reveladas no presente documento, uma ampla variedade de proteínas ou outros constituintes celulares podem ser carregados pelas moléculas

de ácido nucleico da presente revelação. Exemplos não limitantes de tais proteínas incluem componentes celulares nativos ou alterados, bem como proteínas ou constituintes celulares exógenos, encontrados, por exemplo, em vírus, bactérias, parasitas, fungos ou animais tais como mamíferos.

Métodos para Produzir Polipeptídeos

[183] As células hospedeiras da presente revelação, tal como uma célula hospedeira procarionte ou eucarionte, podem ser usadas para produzir (por exemplo, expressar) uma molécula de interesse tal como, por exemplo, um polipeptídeo, codificado em um quadro de leitura aberto de um gene de interesse (GOI) como revelado no presente documento. Assim, o presente pedido fornece adicionalmente métodos para produzir uma molécula de interesse tal como, por exemplo, um polipeptídeo, com o uso das células hospedeiras e/ou das moléculas de ácido nucleico da presente revelação. As células hospedeiras podem ser, por exemplo, células isoladas, células em cultura de células, células em um corpo vivo ou uma combinação dos mesmos.

[184] Algumas modalidades reveladas no presente documento fornecem métodos para produzir um polipeptídeo de interesse. O método pode incluir a introdução de uma molécula de ácido nucleico de acordo com qualquer um dos aspectos e modalidades da presente revelação em uma célula hospedeira, desse modo, produzindo um polipeptídeo codificado pelo GOI

na célula hospedeira. Em algumas modalidades em que a molécula de ácido nucleico introduzida é uma molécula de RNA, por exemplo, uma molécula de mRNA ou um replicão de RNA. A molécula de RNA pode ser gerada por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, por síntese de novo no todo ou em parte. Por exemplo, as moléculas de RNA, que incluem, porém, sem limitação moléculas de mRNA e replicões de RNA, podem ser produzidas com o uso de métodos químicos, técnicas enzimáticas, ou qualquer combinação dos mesmos, por exemplo, por síntese química através de montagem *de novo* (tal como com oligonucleotídeos) ou reações de transcrição *in vitro* (com o uso de enzimas, tampões, nucleotídeos apropriados, etc.). Em alguns casos em que a molécula de ácido nucleico introduzida é um mRNA, o mRNA pode ser entregue diretamente para células *in vivo* para produzir um polipeptídeo de interesse (por exemplo, fármaco, antígeno, etc.) em células. As células podem ser células isoladas; células em culturas de células; células em um tecido, um órgão e/ou um indivíduo; ou qualquer combinação das mesmas. Em algumas modalidades, nenhuma nova cópia de mRNA é produzida nas células. Como revelado no presente documento, a incorporação de uma ou mais estruturas de haste-laço de RNA a partir de um aperfeiçoador de capsídeo viral (por exemplo, motivos de DLP) no RNA sintetizado quimicamente pode conferir o aprimoramento de expressão de gene pretendido

uma vez que o mRNA contendo DLP é introduzido nas células.

[185] Em algumas modalidades em que a molécula de ácido nucleico introduzida é um vetor tal como, por exemplo, um replicação de RNA, podem ser geradas novas cópias de mRNA que incluem sequência de codificação para um gene de interesse ligado de modo operável a um ou mais motivos de DLP. A incorporação do um ou mais motivos de DLP no vetor, por exemplo, replicação de RNA, pode, então, conferir o aprimoramento de expressão de gene pretendido uma vez que o vetor ou replicação contendo DLP é introduzido nas células

[186] Algumas modalidades reveladas no presente documento fornecem métodos para produzir um polipeptídeo de interesse em uma célula hospedeira. Tal método inclui o cultivo de uma célula hospedeira recombinante, que inclui uma molécula de ácido nucleico de acordo com qualquer um dos aspectos e modalidades da presente revelação. Em algumas modalidades, os métodos incluem cultivar a célula hospedeira da presente revelação (na qual um vetor de expressão recombinante que codifica a molécula de interesse, foi introduzido) em um meio adequado de modo que a molécula de interesse é produzida. Em algumas modalidades, os métodos incluem ainda isolar a molécula de interesse do meio ou da célula hospedeira.

[187] Também são revelados métodos para produzir um polipeptídeo de interesse em um indivíduo, que incluem

administrar ao indivíduo uma molécula de ácido nucleico, de acordo com qualquer um dos aspectos e modalidades.

[188] Células hospedeiras adequadas e/ou indivíduos para uso nos métodos e composições revelados no presente documento incluem, porém, sem limitação, espécies procarionte e eucarionte. Células hospedeiras adequadas para serem modificadas com o uso das composições e métodos, de acordo com a presente revelação, podem incluir, porém, sem limitação, células de algas, células bacterianas, heterocontes, células fúngicas, células quitrídias, microfungos, microalgas e células animais. Em algumas modalidades, as células animais são células de animais invertebrados. Em algumas modalidades, as células de animais vertebrados são células de mamíferos. Células hospedeiras podem ser células não transformadas ou células que já tenham sido transfectadas com pelo menos uma molécula de ácido nucleico. Consequentemente, amostras biológicas, biomassa e progênie de uma célula recombinante, de acordo com qualquer um dos aspectos e modalidades também estão dentro do escopo do presente pedido. Assim, como discutido em mais detalhes abaixo, polipeptídeos produzidos por um método, de acordo com esse aspecto do pedido, também estão dentro do escopo desse pedido.

[189] Em algumas modalidades, a célula recombinante é uma célula animal. Produção de proteína terapêutica em

pequena e grande escala é campo importante de desenvolvimento na indústria farmacêutica, devido a acreditar-se que as proteínas produzidas em células animais, em geral, têm modificação pós-translacional com processamento apropriado e, portanto, têm atividade adequada para tratamento da fisiológica condição. Em princípio, qualquer espécie animal pode ser, em geral, usada e pode ser, por exemplo, ser humano, cachorro, ave, peixe, cavalo, porco, primata, camundongo, sigmodon, furão, gado, suíno, ovelhas, coelho, gato, cabra, burro, hamster ou búfalo. Exemplos não limitantes de espécie de ave adequada incluem galinha, pato, ganso, peru, avestruz, ema, cisne, pavão, faisão, perdiz e galinha d'angola. Em algumas modalidades particulares, o peixe é qualquer espécie na família Salmonidae. Células de mamíferos primárias e tipos de células contínuas/imortalizadas também são adequadas. Exemplos não limitantes de células hospedeiras de animais adequadas incluem, porém, sem limitação, célula endotelial de artéria pulmonar equina, célula de derme equina, célula de rim de hamster bebê (BHK), célula de rim de coelho, célula de músculo de camundongo, célula de tecido conjuntivo de camundongo, célula de colo de útero humano, ser células de laringe epidermoide humana, célula de ovário de hamster chinês (CHO), célula HEK-293 humana, célula 3T3 de camundongo, célula Vero, Célula epitelial de rim canino de

Madin-Darby (MDCK), célula primária de fibroblastos de galinha, uma célula HuT78, célula de pulmão A549, célula HeLa, célula PER.C6®, célula WI-38, célula MRC-5, FRhL-2, e célula T CEM. Em algumas modalidades, a célula hospedeira é célula de rim de hamster bebê. Em algumas modalidades, a célula de rim de hamster bebê é uma célula BHK-21.

Polipeptídeos Recombinantes

[190] Algumas modalidades reveladas no presente documento se referem a polipeptídeos recombinantes produzidos por um método, de acordo com uma ou mais modalidades descritas no presente documento. Os polipeptídeos recombinantes do presente pedido podem, em geral, ser quaisquer polipeptídeos recombinantes e podem ser, por exemplo, um ou mais dentre polipeptídeos terapêuticos, polipeptídeos profiláticos, polipeptídeos diagnósticos, polipeptídeos nutracêuticos, enzimas industriais e polipeptídeos repórteres. Em algumas modalidades, os polipeptídeos recombinantes podem ser um ou mais dentre anticorpos, antígenos, moduladores imunes e citocinas. Em algumas modalidades, o polipeptídeo de interesse pode ter atividade terapêutica ou profilática.

Composições e Formulações

[191] Algumas modalidades reveladas no presente documento se referem a uma composição que compreende qualquer um dos polipeptídeos recombinantes descritos no presente

documento. A composição pode ser, por exemplo, uma composição nutracêutica, uma composição profilática, uma composição farmacêutica que compreende um carreador farmacêuticamente aceitável ou uma mistura dos mesmos. Em algumas modalidades, as composições do presente pedido podem ser usadas como uma vacina.

[192] Algumas modalidades reveladas no presente documento se referem a uma composição que inclui qualquer uma das moléculas de ácido nucleico (por exemplo, vetores de expressão) descritas no presente documento. A composição pode ser, por exemplo, uma composição nutracêutica, uma composição profilática, uma composição farmacêutica que compreende um carreador farmacêuticamente aceitável ou uma mistura dos mesmos. Em algumas modalidades, as composições do presente pedido podem ser usadas como uma vacina.

[193] Algumas modalidades reveladas no presente documento se referem a uma composição que inclui qualquer uma das células recombinantes descritas no presente documento. A composição pode ser, por exemplo, uma composição nutracêutica, uma composição profilática, uma composição farmacêutica que compreende um carreador farmacêuticamente aceitável ou uma mistura dos mesmos. Em algumas modalidades, as composições do presente pedido podem ser usadas como uma vacina.

[194] Como usado no presente documento, o termo

“carreador farmacêuticamente aceitável” significa um carreador que é útil para preparar uma composição ou formulação farmacêutica que é, em geral, segura, não tóxica e nem biologicamente tampouco de outra forma indesejável, e inclui um carreador que é aceitável para uso veterinário bem como uso farmacêutico humano. Em algumas modalidades, um carreador farmacêuticamente aceitável é tão simples como água, mas o mesmo também pode incluir, por exemplo, uma solução de concentração salina fisiológica. Em algumas modalidades, um carreador farmacêuticamente aceitável pode ser, ou pode incluir, estabilizadores, diluentes e tampões. Estabilizadores adequados são, por exemplo, SPGA, carboidratos (tais como leite em pó, soro albumina ou caseína) ou produtos de degradação dos mesmos. Tampões adequados são, por exemplo, fosfatos de metal alcalino. Diluentes incluem água, tampões aquosos (tais como soro fisiológico tamponado), álcoois e polióis (tais como glicerol). Para administração para animais ou seres humanos, a composição, de acordo com o presente pedido, pode ser dada por qualquer via enteral ou parenteral, que inclui, entre outros, de modo intranasal, por pulverização, de modo intradérmico, de modo subcutâneo, de modo oral, por aerossol, de modo intramuscular ou qualquer combinação dos mesmos.

[195] Em algumas modalidades, as moléculas de ácido nucleico (por exemplo, mRNAs e/ou vetores de expressão),

moléculas de proteína e/ou composições da revelação estão em formulações adequadas, por exemplo, formulações farmacêuticas. No presente documento são fornecidas formulações farmacêuticas contendo uma ou mais das moléculas e/ou composições reveladas no presente documento em um veículo farmacêuticamente aceitável. Algumas modalidades da revelação se referem a formulações farmacêuticas que compreendem um ou mais dos vetores de expressão revelados no presente documento. Algumas modalidades da revelação se referem a formulações farmacêuticas contendo uma ou mais das moléculas de ácido nucleico reveladas no presente documento. Algumas modalidades da revelação se referem a formulações farmacêuticas contendo um ou mais dos polipeptídeos revelados no presente documento. Algumas modalidades da revelação se referem a formulações farmacêuticas contendo uma ou mais das células recombinantes reveladas no presente documento.

[196] As moléculas (por exemplo, moléculas de proteína e ácido nucleico) e composições reveladas no presente documento podem estar em várias formulações, por exemplo, formulações farmacêuticas. Por exemplo, as moléculas de ácido nucleico (por exemplo, replicões, mRNAs e vetores de expressão), moléculas de proteína e/ou composições da revelação podem ser formuladas, por exemplo, em uma formulação farmacêutica, com um ou mais compostos

covalentes (por exemplo, por meio de ligação direta), compostos não covalentes (por exemplo, por meio de associações de base carregada de LNPs ou nanoemulsões catiônicas), composições físicas (por exemplo, proteínas vault, encapsulamentos de lipídios não carregados), tampões farmacêuticamente aceitáveis (por exemplo, soro fisiológico, Ringer lactato), e quaisquer combinações dos mesmos. Muitos métodos, reagentes e sistemas adequados para gerar as formulações farmacêuticas supraexpostas são conhecidas na técnica.

[197] Em algumas modalidades, moléculas e/ou composições reveladas no presente documento são formuladas em um soro fisiológico ou uma formulação lipídica. A formulação lipídica pode ser selecionada a partir de, porém, sem limitações, liposomas, lipoplexos, copolímeros tais como PLGA, e nanopartículas lipídicas.

Partículas e Nanopartículas

[198] Em algumas modalidades, uma ou mais dentre as moléculas de ácido nucleico, moléculas de polipeptídeo e/ou composições reveladas no presente documento podem ser incorporadas em partículas ou nanopartículas. Partículas que compreendem uma ou mais dentre as moléculas e composições reveladas no presente documento podem ser partículas poliméricas, partículas lipídicas, partículas lipídicas sólidas, partículas automontadas, nanopartículas compostas

de fosfolipídeos conjugados, tensoativos, proteínas, poliaminoácidos, partículas inorgânicas ou combinações dos mesmos (por exemplo, partículas poliméricas estabilizadas por lipídeos). Em algumas modalidades, as moléculas e/ou composições reveladas no presente documento são substancialmente encapsuladas ou parcialmente encapsuladas nas partículas. Em algumas modalidades, as moléculas e/ou composições reveladas no presente documento são depositadas e/ou absorvidas na superfície das partículas. Em algumas modalidades, as moléculas e/ou composições reveladas no presente documento são incorporadas nas partículas. Em algumas modalidades, as moléculas e/ou composições reveladas no presente documento são parte de ou um componente da partícula. As moléculas e/ou composições da revelação podem ser, em algumas modalidades, fixadas à superfície das partículas com ligações covalentes ou interações não covalentes. Em algumas modalidades, as moléculas e/ou composições da revelação automontam em uma partícula.

[199] Como usado no presente documento, o termo "encapsular" significa para delimitar, circundar ou envolver. Conforme o mesmo se refere à formulação das moléculas e/ou composições da presente revelação, encapsulamento pode ser substancial, completo ou parcial. O termo "encapsulado substancialmente" significa que pelo menos mais do que 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99% ou 99,999% das moléculas e/ou composições da presente revelação podem ser delimitadas, circundadas ou envolvidas dentro da partícula. "Encapsulamento parcial" significa que menos do que 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50% das moléculas e/ou composições da presente revelação pode estar delimitado, circundado ou envolvido dentro da partícula. Por exemplo, pelo menos 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9%, 99,99% ou 99,999% das moléculas e/ou composições da presente revelação estão encapsuladas na partícula. O encapsulamento pode ser determinado por qualquer método conhecido.

[200] Em algumas modalidades, as partículas são partículas poliméricas ou contêm uma matriz polimérica. As partículas podem, em geral, conter qualquer um dos polímeros conhecidos na técnica. As partículas, em geral, conterão um ou mais polímeros biocompatíveis. Os polímeros podem ser polímeros biodegradáveis. Os polímeros podem ser polímeros hidrofóbicos, polímeros hidrofílicos ou polímeros anfifílicos. Em algumas modalidades, as partículas contêm um ou mais polímeros que têm uma porção química alvo adicional fixada às mesmas. Em algumas modalidades, as partículas são partículas inorgânicas, tais como, porém, sem limitação, nanopartículas de ouro e nanopartículas de óxido de ferro.

[201] O tamanho das partículas pode ser ajustado

para a aplicação a que se destina. As partículas podem ser nanopartículas ou micropartículas. A partícula pode ter um diâmetro de cerca de 10 nm a cerca de 10 microns, cerca de 10 nm a cerca de 1 micron, cerca de 10 nm a cerca de 500 nm, cerca de 20 nm a cerca de 500 nm ou cerca de 25 nm a cerca de 250 nm. Em algumas modalidades a partícula é uma nanopartícula que tem um diâmetro de cerca de 25 nm a cerca de 250 nm. Em algumas modalidades, a partícula é uma nanopartícula que tem um diâmetro de cerca de 50 nm a cerca de 150 nm. Em algumas modalidades, a partícula é uma nanopartícula que tem um diâmetro de cerca de 70 nm a cerca de 130 nm. Em algumas modalidades, a partícula é uma nanopartícula que tem um diâmetro de cerca de 100 nm. É compreendido pelas pessoas versadas na técnica que uma pluralidade de partículas terá uma faixa de tamanhos e é compreendido que o diâmetro seja diâmetro mediano da distribuição de tamanho da partícula.

[202] Em algumas modalidades, as moléculas e/ou composições reveladas no presente documento podem ser incorporadas em partículas que são responsivas a temperatura, pH e condições iônicas. Por exemplo, as partículas podem compreender uma rede ionizável de monômeros ionizáveis homopoliméricos reticulados de modo covalente em que a rede ionizável é fixada de modo covalente a uma região terminal única de um copolímero anfifílico para formar uma

pluralidade de "cadeias suspensas" e em que as "cadeias suspensas" de copolímero anfifílico formam agregados intrarrede imóveis em solução aquosa, como revelado na Patente nº U.S. 7.204.997.

Liposomas, Lipoplexos, e Nanopartículas Lipídicas (LNPs)

[203] As moléculas e/ou composições da revelação podem ser formuladas com o uso de um ou mais liposomas, lipoplexos e/ou nanopartículas lipídicas. Em uma modalidade, formulações farmacêuticas das moléculas e/ou composições da revelação incluem liposomas. Liposomas são vesículas preparadas artificialmente que podem primariamente ser compostas de uma bicamada lipídica e podem ser usados como um veículo de transporte para a administração de nutrientes e formulações farmacêuticas. Liposomas podem ser de tamanhos diferentes tais como, porém, sem limitação, uma vesícula multilamelar (MLV) que pode ter centenas de nanômetros de diâmetro e pode conter uma série de bicamadas concêntricas separadas por compartimentos aquosos estreitos, uma vesícula unicelular pequena (SUV) que pode ser menor do que 50 nm de diâmetro, e uma vesícula unilamelar grande (LUV) que pode ter entre 50 e 500 nm de diâmetro. Projeto de lipossoma pode incluir, porém, sem limitações, opsoninas ou ligantes a fim de melhorar a fixação de liposomas a tecido não saudável ou para ativar eventos tais como, porém, sem limitação,

endocitose. Liposomas podem conter um pH baixo ou um alto a fim de melhorar a entrega das formulações farmacêuticas.

[204] A formação de liposomas pode depender das características físico-químicas tais como, porém, sem limitação, a formulação farmacêutica retida e os ingredientes lipossômicos, a natureza do meio no qual as vesículas lipídicas são dispersas, a concentração eficaz da substância retida e sua toxicidade potencial, quaisquer processos adicionais envolvidos durante a aplicação e/ou entrega das vesículas, o tamanho de otimização, polidispersidade e o prazo de validade das vesículas para a aplicação a que se destina, e a reprodutibilidade entre lotes e possibilidade de produção em grande escala de produtos lipossômicos seguros e eficientes.

[205] Em algumas modalidades, as moléculas e/ou composições da revelação podem ser formuladas em uma vesícula lipídica que pode ter reticulações entre bicamadas lipídicas funcionalizadas. Em algumas modalidades, as moléculas e/ou composições da revelação podem ser formuladas em um complexo lipídio-policatión. A formação do complexo lipídio-policatión pode ser alcançada por métodos conhecidos na técnica. Como um exemplo não limitante, o policatión pode incluir um peptídeo catiónico ou um polipeptídeo tal como, porém, sem limitação, polilisina, poliornitina e/ou poliarginina e os peptídeos catiónicos. Em algumas

modalidades, as moléculas de ácido nucleico e/ou composições reveladas no presente documento podem ser formuladas em um complexo lipídio-policação que pode ainda incluir um lipídio neutro tal como, porém, sem limitação, colesterol ou dioleil fosfatidiletanolamina (DOPE). A formulação de lipossoma pode ser influenciada, porém, sem limitação, pela seleção do componente lipídio catiônico, o grau de saturação de lipídio catiônico, a natureza da razão de PEGilação de todos os componentes e parâmetros biofísicos tais como tamanho.

[206] Em algumas modalidades, a razão de PEG nas formulações de nanopartícula de lipídio (LNP) pode ser aumentada ou diminuída e/ou o comprimento de cadeia de carbono do lipídio PEG pode ser modificado de C14 para C18 para alterar a farmacocinética e/ou biodistribuição das formulações de LNP. Como um exemplo não limitante, as formulações de LNP podem conter 1 a 5% da razão molar de lipídio de PEG-c-DOMG quando comparadas ao lipídio catiônico, DSPC e colesterol. Em outra modalidade, o PEG-c-DOMG pode ser substituído por um lipídio PEG tal como, porém, sem limitação, PEG-DSG (1,2-Distearoil-sn-glicerol, metoxipoli-etileno glicol) ou PEG-DPG (1,2-Dipalmitoil-sn-glicerol, metoxipoli-etileno glicol). O lipídio catiônico pode ser selecionado a partir de qualquer lipídio conhecido na técnica tal como, porém, sem limitação, DLin-MC3-DMA,

DLin-DMA, C12-200 e DLin-KC2-DMA.

[207] Em algumas modalidades, formulações de LNP descritas no presente documento podem compreender uma composição policatiônica. Em algumas modalidades, as formulações de LNP que compreendem uma composição policatiônica podem ser usadas para a entrega do RNA modificado descrito no presente documento *in vivo* e/ou *ex vitro*. Em algumas modalidades, as formulações de LNP descritas no presente documento podem além disso compreender uma molécula aperfeiçoadora de permeabilidade. As formulações de nanopartícula podem ser uma nanopartícula de carboidrato que compreende um carreador de carboidrato e uma molécula de ácido nucleico modificada (por exemplo, mRNA). Como um exemplo não limitante, o carreador de carboidrato pode incluir, porém, sem limitações, um fitoglicogênio modificado por anidrido ou material tipo glicogênio, fitoglicogênio octenil succinato, fitoglicogênio beta-dextrina, e fitoglicogênio beta-dextrina modificado por anidrido.

[208] Formulações de nanopartícula lipídica podem ser melhoradas substituindo-se o lipídio catiônico por um lipídio catiônico biodegradável que é conhecido como uma nanopartícula de lipídio eliminada rapidamente (reLNP). Lipídios catiônicos ionizáveis, tais como, porém, sem limitação, DLinDMA, DLin-KC2-DMA e DLin-MC3-DMA, têm

mostrado que se acumulam em plasma e tecidos ao longo do tempo e podem ser uma fonte potencial de toxicidade. O metabolismo rápido dos lipídios eliminados rapidamente pode melhorar a tolerabilidade e índice terapêutico das nanopartículas lipídicas por uma ordem de magnitude de uma dose de 1 mg/kg a uma dose de 10 mg/kg em rato. A inclusão de uma ligação éster degradada enzimaticamente pode melhorar a degradação e perfil de metabolismo do componente catiônico, ao mesmo tempo em que ainda mantém a atividade da formulação de reLNP. A ligação éster pode ser localizada internamente dentro da cadeia de lipídio ou pode ser localizada terminalmente na extremidade terminal da cadeia de lipídio. A ligação éster interna pode substituir qualquer carbono na cadeia de lipídio.

[209] Informações adicionais relacionadas a lipídios catiônicos adequados para formulações de LNP podem ser encontradas, por exemplo, na Publicação nº U.S. 2017/0151339, a qual é incorporada em sua totalidade ao presente documento a título de referência.

[210] As moléculas e/ou composições da revelação também podem ser formuladas como uma nanopartícula com o uso de uma combinação de polímeros, lipídios e/ou outros agentes biodegradáveis, tais como, porém, sem limitação, fosfato de cálcio. Componentes podem ser combinados em uma arquitetura núcleo-casca, híbrida e/ou camada a camada, para permitir

ajuste fino da nanopartícula para que a entrega das moléculas e/ou composições da revelação possa ser aprimorada.

[211] As formulações farmacêuticas da presente revelação podem além disso compreender um ou mais excipientes farmaceuticamente aceitáveis, que, como usados no presente documento, incluem qualquer um e todos dentre solventes, meios de dispersão, diluentes ou outros veículos líquidos, auxiliares de dispersão ou suspensão, agentes tensoativos, agentes isotônicos, agentes espessantes e emulsificantes, conservantes, ligantes sólidos, lubrificantes e similares, como adequado para a forma de dosagem particular desejada. Mais informações a esse respeito podem ser encontradas em Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21ª Edição, A. R. Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, Md., 2006) que revela vários excipientes usados em formulação de composições farmacêuticas e técnicas conhecidas para a preparação das mesmas. Salvo na medida em que qualquer meio excipiente convencional seja incompatível com uma substância ou seus derivados, tal como devido a produzir qualquer efeito biológico indesejável ou de outra forma interagir de uma maneira nociva com qualquer outro componente (ou componentes) da composição farmacêutica, seu use é contemplado dentro do escopo dessa revelação.

Exemplos

[212] Alternativas adicionais são reveladas em

detalhes adicionais nos exemplos a seguir, os quais não são de qualquer forma destinados a limitar o escopo das reivindicações.

Exemplo 1

Procedimento Experimental Geral

Preparação de Modelo de DNA

[213] Modelos de DNA plasmídeo foram purificados (Qiagen Número no catálogo 12163) a partir de 300 ml de culturas de *E. coli* TransforMax Epi300 saturado (Epicentre Número no catálogo EC300105) cultivadas em meio de caldo LB (Teknova Número no catálogo L8000 06) complementado com 50ng/ml carbamicilina (Teknova Número no catálogo NC9730116). DNA plasmídeo foi linearizado por digestão *Not*-I (New England Biolabs NEB número no catálogo R3189S) por uma hora a 37 °C. O DNA modelo linearizado foi, então, repurificado (Zymo Número no catálogo D4003), e analisado por gel de agarose a 0,8% (Life Technologies Número no catálogo G5018-08) contra uma escada de DNA 2-log comercial (New England Biolabs, NEB Número no catálogo N3200S). A presença de uma única banda foi confirmada em cada amostra, correspondente ao tamanho de fragmento esperado do modelo de DNA linear, antes de prosseguir com transcrição *ex vitro*.

Transcrição Ex vitro

[214] Reações de transcrição *ex vitro* (IVT) foram realizadas com o uso de 1 µg de modelo de DNA preparado como

descrito acima, em uma reação de 20 µl ao longo de uma incubação de uma hora a 37 °C (NEB número no catálogo E2065S). 1 Unidade de DNase I, fornecida pelo fornecedor foi, então, adicionada diretamente a reação de IVT, e incubada a 37 °C por 15 minutos adicionais. Reações foram, então, colocadas em gelo, e purificadas com o uso do método sugerido pelos fabricantes (Qiagen Número no catálogo 74104). RNA purificado foi, então, quantificado com o uso de um Espectrômetro NanoDrop 2000c UV-Vis. O RNA foi visualizado por eletroforese através de géis de Agarose a 0,8% (Life Technologies Número no catálogo G5018-08) e comparado com Millennium RNA Marker (Ambion Número no catálogo AM7150), antes de prosseguir com a eletroporação.

Transfecção e Análise

[215] Em um experimento de transfecção de célula típico, RNA de replicação foi introduzido em células BHK-21 por eletroporação com o uso do kit SF Cell Line Nucleofector™ para o Sistema 4D-Nucleofector™ (Lonza). As células BHK-21 foram colhidas com o uso de tripsina a 0,25% e lavadas uma vez com PBS frio. As células foram ressuspensas em Tamponante SF em uma densidade de célula de 1×10^6 células por 20 µL de reação de eletroporação. Três microgramas de RNA foram eletroporadas em células em triplicata em uma tira de cubeta de 16 poços e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Células eletroporadas foram recobertas em placas

contendo Meio Águia Modificado de Dulbecco contendo 10% soro bovino fetal, seguido por incubação por 16 a 18 h em condições cultura de células padrão.

[216] Análises intracelulares de eficiência de transfecção de replicação e produção de proteína foram realizadas por citometria de fluxo. Nesses ensaios, células BHK-21 transfectadas foram fixadas e permeabilizadas com o uso de concentrado fix/perm e tamponante de permeabilização (eBioscience). As células foram, então, incubadas com anticorpos para produção de RNA de filamento duplo (anticorpo monoclonal J2 anti-dsRNA IgG2A, English & Scientific Company) conjugado com R-Ficoeritrina (Innova Biosciences). A produção de antígeno foi avaliada por incubação adicional com de anticorpos específicos do antígeno conjugados com PE-Cy5 (Innova Biosciences) (por exemplo, anticorpos para Firefly vermelho, Renilla verde, HA ou RSV-F0 (Abcam)). As células foram, então, lavadas uma vez e analisadas com o uso de um Classificador de Células de Fusão FACSAria™ (BD Biosciences) ou Classificador de Células II FACSAria™ (BD Biosciences). Células BHK-21 transfectadas tingidas com cores únicas para compensação controles foram executados antes da coleta de amostra. Dados foram coletados com o uso de FACSDiva (BD Biosciences) e analisado adicionalmente com o uso do software FlowJo. Canalização inicial foi realizada para excluir células mortas e impurezas com o uso de tramas

dispersas dianteiras e laterais. Canalização adicional foi conduzida para identificar populações de célula que foram positivas para expressão tanto de dsRNA (R-PE-positivo) quanto de proteína (PE-Cy5-positiva ou FITC-positiva para expressão de GFP). Intensidades de fluorescência de frequências e média foram coletadas e utilizadas para comparação e otimização de construto.

Exemplo 2

Construção de Projetos de Replicação de EAV contendo DLP

[217] Esse Exemplo descreve a geração de um número de vetores de expressão com base em replicação de RNA de arterivírus com um motivo de DLP posicionado de modo operável a montante da poliproteína/genes de proteína não estrutural e/ou um gene repórter. Esses vetores de expressão com base em replicação de RNA de arterivírus foram posteriormente caracterizados e analisados na análise de citometria de fluxo e análises de luciferase essencial descritos no Exemplo 4.

A. Projeto

[218] Os respectivos recursos de projeto de quatro construtos de replicação de DLP com base em EV são descritos abaixo.

(1) rEX-DLP-rFF

[219] Nesse construto, um motivo de DLP foi colocado imediatamente a montante de rFF e a jusante do TRS7 que dirige a transcrição de rFF.

(2) rEX-DLP-pplab-rFF

[220] Nesse construto, um motivo de DLP foi colocado imediatamente a montante dos genes pplab com poucas modificações de projeto cuidadosas descritas abaixo para manter a estrutura de haste-laço na 5' UTR do replicação conhecida por ser essencial para replicação e transcrição de mRNA subgenômico.

[221] (i) Os primeiros 79 nucleotídeos do gene viral não estrutural 1a são duplicados com seu códon inicial mutado de ATG para TAG, denotado como "região de deslocamento de ATG" (em **negrito** na sequência de SEQ ID NO: 2 abaixo).

[222] (ii) Os nucleotídeos correspondentes, localizados a montante do gene 1a, em emparelhamento de base com seu códon inicial ATG e formando a haste, também foram mudados adequadamente de CAT para CTA (sublinhado na sequência de SEQ ID NO: 2 abaixo).

[223] (iii) DLP (em *itálico* na sequência abaixo) foi colocado imediatamente a jusante da "região de deslocamento de ATG" e a montante dos genes lab de poliproteína (códon inicial ATG mostrado na sequência de SEQ ID NO: 2 abaixo).

SEQ ID NO: 2 (sequência parcial)

CGAAGTGTGTATGGTGCCATATACGGCTCACCACCATATACACTGCAAGAATTACTATT
CTTGTGGGCCCCTCTCGGTAAATCCTAGAGGGCTTTCCTCTCGTTATTGCGAGATTCGT
CGTTAGATAACGGCAAGTTCCTTTCTTACTATCCTATTTTCATCTTGTGGCTTGACGG

GTCACTGCCTACGTCGTCGATCTCTATCAACTACCCTTGCGACTTAGGCAACCTTCTCC
GCTACTGGATTTGGAGGGAGTTTTGTTAGGGACTGGTCCCTGGACTTACCCGACGCTTG
TGAGCATAGTCAGCATAGTACATTTTCATCTGACTAATACTACAACACCACCACCATGAA
 TAGAGGATTCTTTAACATGCTCGGCCGCCGCCCTTCCCGGCCCCCACTGCCATGTGGA
 GGCCGCGGAGAAGGAGGCAGGCGGCCCGATGATGGCAACCTTCTCCGCTACTGGATTT
 GGAGG...

[224] Esse construto foi essencialmente idêntico ao segundo construto, em que DLP foi colocado seguindo as mesmas três modificações de projeto, exceto que uma sequência de protease 2A (SEQ ID NO: 3) foi adicionada imediatamente no final 3' de DLP de modo que, quando transladadas, as poliproteínas poderiam ser liberadas do peptídeo derivado de DLP através de uma clivagem seletiva pela protease. Uma análise comparativa de desempenhos por replicação de Construto 2 (descrita acima) e Construto 3 forneceria informações sobre a necessidade da protease 2A para um replicação funcional (consultar Exemplo 4 abaixo).

SEQ ID NO: 3

GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCC
 TGGACCT

(4) rEX-DLP-2A-pplab-DLP-rFF

[225] Esse construto foi essencialmente idêntico ao terceiro construto descrito acima, exceto que outro DLP foi colocado imediatamente a montante do gene rFF repórter (da mesma forma que um motivo de DLP foi colocado no construto

1). Uma análise comparativa de desempenhos por replicação de Construto 3 (descrito acima) e Construto 4 forneceria informações sobre se a colocação de DLP adicional a montante do gene repórter tem um valor adicionado à expressão do gene repórter.

B. Construção

[226] rEx-DLP-rFF foi construído de acordo com um procedimento de Gibson Assembly® de 3 peças descrito em Gibson et al. (Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343 a 345, 2009) com rEx-rFF (c4; SEQ ID NO: 34) digerido com SphI e EcoRI como um vetor e um bloco g contendo DLP como um inserto. A sequência de ácidos nucleicos do bloco g usado para construção de rEx-DLP-rFF é estabelecida na SEQ ID NO: 4 na Listagem de Sequência.

[227] Os iniciadores seguintes foram projetados para amplificar os fragmentos correspondentes exigidos para construir os 3 novos construtos de replicação de DLP com base em EV descritos acima.

Tabela 3

Iniciador	Iniciadores projetados para construção de replicões de DLP-(2A)-pp1ab-rFF/DLP-rFF	
RP114	pp1a-DLP-F	GCCATGTGGAGGCCGCGGAGAAGGAGGCAGGCG GCCCCGATGATGGCAACCTTCTCCGCTACTGGAT (SEQ ID NO: 5)
RP115	pBR322-3'SrfI-R	ACAATGTTGCCTCCCACATCTGCAA (SEQ ID NO: 6)

RP116	pBR322- 3' SrfI-F	GGGTCACAAGGTAGTCGCCGTGGTT (SEQ ID NO: 7)
RP117	pBR322-bla- R	ACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAA (SEQ ID NO: 8)
RP118	pp1a-DLP- 2A-F	AGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAG AACCCTGGACCTATGGCAACCTTCTCCGCTACTGG AT (SEQ ID NO: 9)

Construção de rEx-DLP-pplab-rFF

[228] Para a construção do vetor rEx-DLP-pplab-rFF, três fragmentos de ácido nucleico foram gerados com o uso de um procedimento Gibson Assembly® de 3 peças, como segue.

[229] O fragmento 1 foi gerado com iniciadores RP114 e RP115 e o cerne do modelo rEx-rFF.

[230] O fragmento 2 foi gerado com iniciadores RP116 e RP117 e o cerne do modelo rEx-rFF.

[231] O fragmento 3 foi um bloco g para rEx-DLP-pplab-rFF com a sequência de ácidos nucleicos estabelecida na SEQ ID NO: 10 na Listagem de Sequência.

Construção de rEx-DLP-2A-pplab-rFF

[232] Para a construção do vetor rEx-DLP-2A-pplab-rFF, três fragmentos de ácido nucleico foram gerados com o uso de um procedimento Gibson Assembly® de 3 peças, como segue.

[233] O fragmento 4 foi gerado com iniciadores RP118 e RP115 e o cerne do modelo rEx-rFF.

[234] O fragmento 5 foi gerado com iniciadores RP116 e RP117 e o cerne do modelo rEx-rFF.

[235] O fragmento 6 foi um bloco g para rEx-DLP-2A-pplab-rFF com a sequência de ácidos nucleicos estabelecida na SEQ ID NO: 11 na Listagem de Sequência.

Construção de rEx-DLP-2A-pplab-DLP-rFF

[236] Para a construção do vetor rEx-DLP-2A-pplab-DLP-rFF, três fragmentos de ácido nucleico foram gerados com o uso de um procedimento Gibson Assembly® de 3 peças, como segue.

[237] O fragmento 7 foi gerado com iniciadores RP118 e RP115 e o cerne do modelo rEx-DLP-rFF.

[238] O fragmento 8 foi gerado com iniciadores RP116 e RP117 e o cerne do modelo rEx-DLP-rFF.

[239] O fragmento 9 foi um bloco g para rEx-DLP-2A-pplab-DLP-rFF com a sequência de ácidos nucleicos estabelecida na SEQ ID NO: 12 na Listagem de Sequência.

[240] A montagem de construto foi realizada de acordo com um procedimento Gibson Assembly® de 3 peças descrito em Gibson *et al.* (2009, *supra*). Em particular, o construto rEx-DLP-pplab-rFF foi construído com o uso de fragmentos 1, 2 e 3; o construto rEx-DLP-2A-pplab-rFF foi construído com o uso de fragmentos 4, 5 e 6; e o construto rEx-DLP-2A-pplab-DLP-rFF foi construído com o uso de fragmentos 7, 8 e 9. Os produtos montados foram posteriormente transformados em células EPI300 a partir do Epicentro. Um total de 144 colônias foram examinadas com o

uso dos iniciadores RP126 (SEQ ID NO: 13) e RP127 (SEQ ID NO: 14) para cada transformação, que resulta em 4 clones PCR positivos para rEx-DLP-pplab-rFF, 3 clones PCR positivos para rEx-DLP-2A-pplab-rFF e 2 clones PCR positivos para rEx-DLP-2A-pplab-DLP-rFF. Resultados de MiSeq subsequentes revelaram que clone 4, clones 3 e 15, e clones 18 e 20 estavam completamente corretos na sequência para rEx-DLP-pplab-rFF, rEx-DLP-2A-pplab-rFF, e rEx-DLP-2A-pplab-DLP-rFF, respectivamente.

Tabela 4

Iniciador	Iniciadores projetados para triagem de colônia dos replicões DLP-(2A)-pplab	
RP126	DLP-pplab-screen-F	CAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTG (SEQ ID NO: 13)
RP127	DLP-pplab-screen-R	GGAAGTGGCGAAGCCAGTTTAAACA (SEQ ID NO: 14)

[241] Os mapas de rEx-DLP-rFF, rEx-DLP-pplab-rFF, rEx-DLP-2A-pplab-rFF, e rEx-DLP-2A-pplab-DLP-rFF também são mostrados nas Figuras 2A a 2D.

[242] As sequências dos replicões resultantes são reveladas na Listagem de Sequência com um promotor T7 e uma cauda poliA de 65 A's, como segue: rEx-DLP-rFF (SEQ ID NO: 15), rEx-DLP-pplab-rFF (SEQ ID NO: 16), rEx-DLP-2A-pplab-rFF (SEQ ID NO: 17), e rEx-DLP-2A-pplab-DLP-rFF (SEQ ID NO: 18).

Exemplo 3

Construção de Projetos de Replicação de Alfavírus

Contendo DLP

[243] Esse Exemplo descreve a geração de um número de vetores de expressão com base em replicação de RNA de Alfavírus com um motivo de DLP posicionado a montante da poliproteína/genes de proteína não estrutural e/ou um gene repórter. Esses vetores de expressão com base em replicação de RNA de Alfavírus foram posteriormente caracterizados e analisados na análise de citometria de fluxo e análises de luciferase essenciais descritos no Exemplo 5.

A. Projeto

[244] Os respectivos recursos de projeto de três construtos de replicação de DLP com base em Alfavírus são descritos abaixo.

(1) Alfa-R-DLP-rFF

[245] Nesse construto, DLP foi colocado imediatamente a montante do códon inicial do gene repórter rFF.

(2) Alfa-R-DLP-2A-nsp-rFF

[246] Nesse construto, a sequência que codifica o motivo de DLP e a sequência de peptídeos 2A (que foi a mesma sequência usada na replicação rEx-DLP-2A-pplab-rFF descrito no Exemplo 2 acima) foram colocadas dentro do final 5' do replicação com umas poucas modificações de projeto cuidadosas descritas abaixo, para potencialmente manter a exigência de sequência-estrutura para replicação e transcrição de mRNA

subgenômico.

[247] (i) Os primeiros 195 nucleotídeos do gene nspl foram duplicados com seu códon inicial mutado de ATG para TAG (em negrito na sequência de SEQ ID NO: 19 abaixo).

[248] (ii) Essa sequência de 195 nucleotídeos duplicados foi colocada imediatamente seguindo o 5' UTR do Alfavírus tipo selvagem (sublinhado na sequência de SEQ ID NO: 19 abaixo) e é seguida pela sequência DLP-2A (em itálico na sequência abaixo).

[249] (iii) O códon inicial do gene nspl seguindo a sequência DLP-2A foi removido (transpassado na sequência de SEQ ID NO: 19 abaixo).

SEQ ID NO: 19 (sequência parcial)

GATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACCCAAATAGGAGAAAGTTCA
 CGTTGACATCGAGGAAGACAGCCCATTCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGT
 TTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTTCG
 CATCTGGCTTCAAACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCTTGACAT
 TGGAATAGTCAGCATAGTACATTTTCATCTGACTAATACTACAACACCACCACCATGAAT
 AGAGGATTCTTTAACATGCTCGGCCGCCGCCCTTCCCGGCCCCCACTGCCATGTGGAG
 GCCGCGGAGAAGGAGGCAGGCGGCCCGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGA
 AGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT**ATG**GAGAAAGTTTCACG...

(3) Alfa-R-DLP-2A-nsp-DLP-rFF

[250] Esse construto é essencialmente idêntico ao Construto 2 seguindo as mesmas três modificações de projeto, exceto que outro motivo de DLP foi colocado imediatamente a

montante do gene rFF repórter (da mesma forma que um motivo de DLP foi colocado no Construto 1). Uma análise comparativa de desempenhos por replicação de Construtos 2 e 3 forneceria informações sobre se a colocação de DLP adicional a montante do gene repórter tem um valor adicionado à expressão do gene repórter (consultar Exemplo 5 abaixo).

B. Construção

Construção de Alfa-R-DLP-rFF

[251] Alfa-R-DLP-rFF foi construído por meio de procedimento de Gibson Assembly®, com o uso de Alfa-R-eGFP (c6; SEQ ID NO: 35) digerido com EcoRI/SapI como um vetor e DLP-rFF como um inserto amplificado por PCR a partir do modelo rEx-DLP-rFF (c2, SEQ ID NO: 15) com o uso dos iniciadores RP112 (SEQ ID NO: 20) e RP113 (SEQ ID NO: 21) para substituir eGFP por DLP-rFF. Os Clones 2 e 3 tiveram a sequência confirmada como completamente correta por meio de sequenciamento de MiSeq.

Tabela 5

Iniciador	Iniciadores usados para clonar DLP-rFF para Alfa-R-GFP (EcoRV/SapI)	
RP112	DLP-rFF-F	CCTGAATGGACTACGACATAGTCTAGTCCGCCAAGAT ATCGCACCATAGTCAGCATAGTACATTTTCATCTGAC TAATACT (SEQ ID NO: 20)
RP113	DLP-rFF-R	GCAGCTTGCCAATTGCTGCTGTATCGATCAATT AATCACATCTTGCCACGGGTTTCTTC (SEQ ID NO: 21)

Construção de Alfa-R-DLP-2A-nsp-rFF e Alfa-R-DLP-2A-

nsp-DLP-rFF

[252] Alfa-R-DLP-2A-nsp-rFF (Construto 2) e Alfa-R-DLP-2A-nsp-DLP-rFF (Construto 3) foram construídos por meio de procedimento de Gibson Assembly®, com o uso dos respectivos blocos g como insertos e os vetores que foram amplificados por PCR a partir dos respectivos modelos, Alfa-R-rFF (c6; SEQ ID NO: 35) e Alfa-R-DLP-rFF (c2; SEQ ID NO: 26), com o uso dos iniciadores RP124 (SEQ ID NO: 22) e RP125 (SEQ ID NO: 22) e RP125 (SEQ ID NO: 23). Clones 1 e 3 de Alfa-R-DLP-2A-nsp-rFF e clones 8 e 32 de Alfa-R-DLP-2A-nsp-DLP-rFF tiveram a sequência confirmada como completamente correta por meio de MiSeq.

Tabela 6

Iniciador	Iniciadores usados para construção de Alfa-DLP-nsp-rFF/DLP-rFF	
RP124	5'Alfa-P2A-F	GAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCT GGACCTGAGAAAGTTACGTTGACATCGAGGA AGAC (SEQ ID NO: 22)
RP125	5'ScaI-R	CACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATG (SEQ ID NO: 23)

[253] A sequência de bloco g usada para a construção de Alfa-R-DLP-2A-nsp-rFF é fornecida na Listagem de Sequência como SEQ ID NO: 24. A sequência de bloco g usada para a construção de Alfa-R-DLP-2A-nsp-DLP-rFF também é fornecida na Listagem de Sequência como SEQ ID NO: 25.

[254] Os mapas de Alfa-R-rFF, Alfa-R-DLP-rFF, Alfa-R-DLP-2A-nsp-rFF e Alfa-R-DLP-2A-nsp-DLP-rFF são mostrados

nas **Figuras 3A a 3D.**

[255] As sequências dos replicões resultantes também são fornecidas na Listagem de Sequência com um promotor T7 e uma cauda polia de 40 A's, como segue: Alfa-R-rFF (SEQ ID NO: 26), Alfa-R-DLP-rFF (SEQ ID NO: 27), Alfa-R-DLP-2A-nsp-rFF (SEQ ID NO: 28), e Alfa-R-DLP-2A-nsp-DLP-rFF (SEQ ID NO: 29).

Construção de Alfa-R-DLP-2A-rFF e Alfa-R-DLP-2A-nsp-DLP-2A-rFF

[256] Sem estar limitado por qualquer teoria em particular, acredita-se que colocar um motivo de DLP imediatamente a montante do gene repórter rFF sem a inclusão da protease 2A entre os mesmos pode impactar negativamente expressão de proteína do GOI; esse impacto negativo poderia ser devido ao fato de que rFF agora se torna uma proteína de "fusão", que resulta da presença da sequência de DLP transladado para um peptídeo no final 5' de rFF. Portanto, 2 novos construtos foram projetados e construídos, incluindo a sequência de protease 2A entre o motivo de DLP e o gene rFF para os dois construtos de replicação de Alfavírus, Alfa-R-DLP-rFF e Alfa-R-DLP-2A-nsp-DLP-rFF, para gerar Alfa-R-DLP-2A-rFF e Alfa-R-DLP-2A-nsp-DLP-2A-rFF, respectivamente. A inclusão da sequência de peptídeos de protease 2A permitiria clivagem do peptídeo codificado pela sequência de DLP a partir de rFF (consultar Exemplo 5 abaixo).

[257] Para esse fim, dois fragmentos de bloco g foram sintetizados (SEQ ID NOS: 30 e 31) e clonados para seus respectivos vetores digeridos com EcoRV/SbfI por meio de Montagem de Gibson. O clone 1 de Alfa-R-DLP-2A-rFF e os clones 8 e 9 de Alfa-R-DLP-2A-nsp-DLP-2A-rFF tiveram a sequência confirmada como completamente correta por meio de sequenciamento de Sanger com o uso de RP123 (SEQ ID NO: 32) e RP96 (P89; SEQ ID NO: 96).

Tabela 7

Ini- ciador	Iniciadores usados para sequenciar construtos Alfa-R- (DLP-2A-nsp) -DLP-2A-rFF	
R P123	Alfa- 3'nsp4-F	GGCTGTTTAAGCTTGGCAAACCTCT (SEQ ID NO: 32)
R P96	rFF- seq1	AGCGAGAACTGCGAGGAATTCTT (SEQ ID NO: 33)

[258] Mapas esquemáticos de Alfa-R-DLP-2A-rFF e Alfa-R-DLP-2A-nsp-DLP-2A-rFF são fornecidos nas **Figuras 4A a 4B**.

Exemplo 4

Análise de Expressão de Replicões Contendo DLP com Base em EAV

[259] Como apresentado nos Exemplos 2 e 3 acima, um número de replicões contendo DLP com base em EAV foram construídos para determinar o impacto de modificar um motivo de DLP posicionado a montante dos genes de proteína não estrutural de replicação ou o gene GOI em um mRNA subgenômico

(Tabela 8).

Tabela 8: LISTAGEM DE REPLICÇÕES DE EAV CONTENDO DLP E REPLICÇÕES DE VEEV CONTENDO DLP.

Replicções DLP EAV
rEx-DLP-rFF
rEx-DLP-2A-rFF
rEx-DLP-pplab-rFF
rEx-DLP-2A-pplab-rFF
rEx-DLP-2A-pplab-DLP-rFF
rEx-DLP-2A-pplab-DLP-2A-rFF
Replicções DLP VEEV
alfa-R-DLP-rFF
alfa-R-DLP-2A-rFF
alfa-R-DLP-2A-nsp-rFF
alfa-R-DLP-2A-nsp-DLP-rFF
alfa-R-DLP-2A-nsp-DLP-2A-rFF

[260] Caracterização inicial dos construtos de replicação de DLP foi realizada *ex vitro*. RNA foi produzido e usado para células de BHK eletroporadas como descrito no Exemplo 1 acima. Após a eletroporação as células foram analisadas para expressão de proteína por análise de FACs, Western blot ou ensaio de luciferase a granel.

[261] Um sumário gráfico dos resultados de experimentos realizados para medir o nível de expressão de um gene de interesse exemplificativo (GOI), repórter luciferase rFF, a partir de replicções de DLP com base em EAV é mostrado na **Figura 5**. Dados tanto de análise FACs quanto

de luciferase a granel são apresentados. Nesses experimentos, quatro replicões de DLP EAV diferentes foram analisados como segue:

[262] 1) rEx-DLP-rFF: um replicação com base em EAV com um motivo de DLP posicionado a montante ao transcrito de mRNA subgenômico rFF);

[263] 2) rEx-DLP-pplab-rFF: um replicação com base em EAV com DLP posicionado a montante aos genes pplab não estruturais);

[264] 3) rEx-DLP-2A-pplab-rFF: um replicação com base em EAV com um motivo de DLP posicionado a montante das proteínas não estruturais e um peptídeo de protease 2A posicionado entre o DLP e a região pplab); e

[265] 4) rEx-DLP-2A-pplab-DLP-rFF: um replicação com base em EAV com um primeiro motivo de DLP posicionado a montante das proteínas não estruturais e um peptídeo de protease 2A posicionado entre o DLP e a região pplab bem como um segundo motivo de DLP posicionado a montante ao transcrito de mRNA subgenômico rFF).

[266] Os resultados apresentados nas **Figuras 5A e 5B** demonstraram que modificar um motivo de DLP a montante dos genes de proteína não estrutural de EAV (por exemplo, rEx-DLP-pplab-rFF, rEx-DLP-2A-pplab-rFF ou rEx-DLP-2A-pplab-DLP-rFF) ou do RNA subgenômico de gene repórter rFF (por exemplo, rEx-DLP-rFF e rEx-DLP-2A-pplab-DLP-rFF) não

impactou negativamente a replicação de RNA genômico uma vez que todos os quatro construtos demonstraram eficiências de eletroporação quase idênticas (**Figura 5A**).**5A**). Curiosamente, análise de atividade de luciferase a granel demonstrou que o replicação rEx-DLP-pplab-rFF expressou luciferase significativamente menor do que os outros três projetos de replicação (**Figura 5B**).**5B**). Como exposto acima, a incorporação de um motivo de DLP a montante de qualquer GOI resultaria em uma fusão terminal N de aminoácidos de capsídeo Sindbis codificados nos códons enquadrados encontrados na sequência de DLP. Acredita-se que a proteína de fusão gerada com o DLP que codifica aminoácidos e a proteína nsP1 de EAV impactam a produção de forma eficiente de RNAs subgenômicos pela replicação de EAV complexa e resultam nos níveis de expressão de GOI de rFF reduzidos observados. Um dos resultados mais notáveis desse estudo foi que construtos de replicação de EAV com um DLP que controla a translação dos genes de proteína não estrutural (rEx-DLP-pplab-rFF, rEx-DLP-2A-pplab-rFF e rEx-DLP-2A-pplab-DLP-rFF) foram transladados de forma eficiente tão eficiente quanto o RNA de replicação que não tinha um DLP nessa posição (rEx-DLP-rFF). Esse resultado não seria previsto com base em trabalho conduzido por outros pesquisadores. Foi relatado anteriormente que a incorporação sequências de RNA subgenômico de vírus de Sindbis 5' (que inclui a região de DLP) foi transladada de forma eficiente

apenas em células infectadas com o vírus. Exposto de outra forma, foi relatado que mRNA contendo um motivo de DLP associado a um gene repórter é insuficientemente traduzado em células que não foram infectadas com vírus de Sindbis. A ausência de ativação imune inata nessas células tornou o mRNA modificado com DLP em uma desvantagem de translação distinta em relação à translação de mRNAs que carecem da modificação de DLP (todos os mRNAs celulares). O sistema imune inato não foi ativado nessas células no momento que os vetores de replicação contendo DLP foram introduzidos assim esses mRNAs contendo DLP (capazes de autoamplificação) devem ser traduzados de modo muito ineficiente. Inesperadamente, isso não foi comprovado nos experimentos apresentados no presente documento.

[267] Posteriormente, o replicação rEx-DLP-2A-pplab-rFF EAV foi examinado em células que foram tratadas com IFN para induzir o sistema imune inato celular. Tratamento com IFN de células BHK induzirá ativação de PKR e fosforilação de eIF2 α que, por sua vez, resulta em desativação de translação de mRNA celular global. Foi relatado anteriormente que arterivírus são sensíveis a tratamento com IFN (Luo *et al.* *Antiviral Res.*, agosto de 91(2):99 a 101, 2011), portanto, o tratamento com IFN de células BHK, as quais são capazes de responder à exposição a IFN e induzir o sistema imune inato, resultaria em desativação de

replicação de arterivírus. Um exemplo representativo da capacidade de expressão do replicação de EAV modificado com DLP na presença de ativação de sistema imune inato é mostrado na **Figura 6**. O replicação rEx-DLP-2A-pplab-rFF demonstrou resistência significativa à ativação do sistema imune inato quando comparado a um replicação de EAV que não foi modificado para conter o motivo de DLP, isto é, rEx-rFF. Tanto a replicação (**Figura 6A**) quanto a expressão (**Figura 6B**) do replicação rEx-DLP-2A-pplab-rFF foram significativamente superiores em células tratadas com IFN, em comparação ao replicação rEx-rFF de controle. Esses dados demonstram que replicações de EAV modificados com DLP são capazes de superar desativação de sistema imune inato e que esse vetor de replicação representa um avanço significativo em tecnologia de RNA de autoamplificação.

Exemplo 5

Análise de Expressão Replicções de VEEV Contendo DLP

[268] Como apresentado nos Exemplos 2 e 3 acima, um número de replicções contendo DLP com base em VEEV foram construídos para determinar o impacto de modificar um motivo de DLP posicionado a montante dos genes de proteína não estrutural de replicação ou o gene GOI em um mRNA subgenômico.

[269] Vetores de replicação de alfavírus de VEEV foram modificados para conter um ou mais motivos de DLP com o uso de uma estratégia similar para a construção de vetores de

replicação com base em EAV. Principalmente, diferente de outros membros do gênero Alfavírus (a maior parte dos membros de vírus do Velho Mundo), o genoma de VEEV não contém um motivo de DLP associado à translação de seu mRNA subgenômico. Análise inicial dos replicões de DLP de VEEV foi realizada em células BHK-21 como descrito no Exemplo 1 acima. As células BHK-21 não secretam IFN em resposta à replicação de RNA mas essas células são capazes de responder a IFN exógeno para induzir ativação imune inata. Nesse experimento, quatro construtos de replicação de alfavírus diferentes foram testados. Os dados experimentais apresentados na **Figura7** mostram replicação de replicação de alfavírus contendo DLP e expressão do gene de luciferase rFF em células BHK que foram tratadas no momento de eletroporação (0 h) ou em 3 h pós-eletroporação com 1.000 U/ml de IFN exógeno. Os RNAs de replicação testados foram:

[270] 1) Alfa-R-rFF: um replicação com base em VEEV de controle sem DLP presente;

[271] 2) Alfa-R-DLP-rFF: um replicação com base em VEEV com um motivo de DLP posicionado a montante do mRNA subgenômico rFF transcrito;

[272] 3) Alfa-R-DLP-2A-nsp-rFF: um replicação com base em VEEV com um motivo de DLP posicionado a montante das proteínas não estruturais com uma protease 2A entre o DLP e a região de nsp; e

[273] 4) Alfa-R-DLP-2A-nsp-DLP-rFF: com base em replicação de VEEV com um primeiro motivo de DLP posicionado a montante das proteínas não estruturais com uma protease 2A entre o DLP e a região de nsp bem como com um segundo motivo de DLP posicionado a montante do mRNA subgenômico rFF transcrito.

[274] Os resultados de expressão de luciferase normalizados para o número de células positivas detectadas por análise de FACs são mostrados na **Figura 7**. Foi observado que a presença de um motivo de DLP que controla a translação dos genes de proteína não estrutural VEEV resultou em expressão de gene repórter superior tanto na ausência quanto na presença de tratamento com IFN pós-eletroporação (**Figuras 7A a 7C**). Embora o aumento em expressão de rFF possa ter sido considerado insignificante estatisticamente, a tendência em todas as condições foi para expressão de proteína aumentada. Como exposto acima no Exemplo 4 em relação a replicões de EAV contendo DLP, pode ter-se esperado que um motivo de DLP teria um impacto negativo sobre translação de mRNA em células que não estão em um estado ativado de resposta imune inata. Em contraste direto com aquela expectativa, as células BHK que não foram tratadas com IFN (**Figura 7A**) nesses experimentos representas a amostra com o maior benefício para incorporação de um motivo de DLP.

[275] Posteriormente, os dois replicões de RNA

alfa-R-rFF e alfa-DLP-2A-nsp-rFF foram testados *in vivo* em camundongos Balb/c. Nesse experimento, camundongos foram testados em grupos de 10 animais. Nesses experimentos, doses iguais de RNA foram injetadas de forma intramuscular em camundongos e a análise IVIS (Sistema de Imageamento *In vivo*) de corpo inteiro foi realizada no curso de uma semana. O imageamento de corpo inteiro foi realizado no dia 1, dia 3 e dia 7 pós-injeção. O fluxo total medido no local de injeção é mostrado na **Figura 8**. Embora apenas aumentos modestos em expressão de proteína tenham sido observados *ex vitro* (**Figura 8**) a partir da replicação de VEEV modificado por DLP, expressão de proteína significativamente superior estatisticamente foi detectada a todo momento em pontos medidos a partir do RNA de replicação de VEEV modificado com DLP (**Figura 8**). Essa observação representa uma vantagem significativa, devido a como vetores de replicação de VEEV não modificados são capazes de expressão de proteína muito alta que pode alcançar até 20% da proteína celular total (Pushko et al 1997). O replicação de VEEV modificado por DLP superou mesmo esse potencial de expressão e demonstrou expressão de proteína superior; por este motivo, o vetor de replicação de alfavírus modificado por DLP representa um avanço significativo sobre a tecnologia de RNA de replicação de alfavírus existente.

[276] Há pelo menos três resultados inesperados que podem ser extraídos a partir dos dados experimentais

apresentados nos Exemplos acima. Em primeiro lugar, o motivo de DLP mostrou que impacta negativamente a translação de mRNAs quando uma célula não está em um estado ativado de sistema imune inato. Foi constatado que os RNAs de replicação contendo DLP revelados no presente documento não foram impactados negativamente em células em um estado basal de ativação inata. Em segundo lugar, foi constatado que os níveis de expressão, especialmente para os replicões de VEEV contendo DLP, foram até mesmo superiores aos replicões não modificados *in vivo*; essa observação demonstrou que níveis de expressão mesmo a partir de um replicão de alfavírus podem ser aumentados a partir de níveis de expressão históricos altos anteriormente. Em terceiro lugar, todos os vírus de RNA de filamento positivo têm conservação de sequência considerável nos finais tanto 5' quanto 3' de seus genomas. O fato de que tanto o replicão de VEEV quanto o replicão de EAV são flexíveis o suficiente para aceitar incorporação de uma estrutura de haste-laço (o DLP) no final 5' de seus RNAs é inesperado.

Exemplo 6

Resposta de Imunogenicidade *in vivo* com o Uso de Sistemas de Expressão de Replicação de DLP

[277] Vetores de replicação de alfavírus foram modificados para conter um ou mais motivos de DLP, como descrito acima. O replicão de RNA, Alfa-R-gDLP-HA, contendo

a sequência de DLP foi analisado adicionalmente *in vivo* em camundongos Balb/c. Nesse experimento, 15 µg, 1,5 µg, ou 0,15 µg de RNA que codifica Hemaglutinina a partir de Influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) foram injetados em camundongos em intervalos separados por 6 semanas. Quatorze dias após o reforço final, baços e soro foram coletados para analisar as respostas imunes à HA. Um sumário dos resultados desses experimentos é apresentado nas **Figuras 12A a 12C**. Na **Figura 12A**, um aumento significativo em células efectoras precursoras de memória (MPECs) foi observado em construtos contendo o motivo de DLP comparado a cada dose comparável de um replicação não modificado. MPECs de HA específico foram detectados com o uso de dextrâmeros (H-2 Kd (IYSTVASSL; SEQ ID NO: 44)) juntamente com outros marcadores para população específica ($CD8^+CD44^+CD62L^{Lo}KLRG-1^{Lo}IL-7Ra^{Hi}CXCR3^{Hi}$). Vale salientar que esse benefício também foi observável em doses baixas. Nas **Figuras 12B e 12C**, respostas de célula T de efector foram medidas pelo número de células de HA de antígeno específico que estavam secretando IFN-γ seguindo a estimulação com um célula T $CD4^+$ ou peptídeo de célula T $CD8^+$. Animais imunizados com replicões contendo o motivo de DLP que tiveram uma frequência significativamente superior de expressão de citocina de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ são as doses de 15 ug e 1,5 ug. Tomados em conjunto, esses dados indicam um aumento significativo em tanto em efector quanto

memória de respostas de célula T em resposta à imunização com antígeno expressa por replicões contendo o motivo de DLP quando comparado à versão não modificada.

[278] Os replicões contendo DLP acima foram adicionalmente analisados *in vivo* em camundongos Balb/c para compatibilidade com formulações de LNP. Nesse experimento, 2 µg ou 0,2 µg de RNA que codifica Hemaglutinina a partir de Influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) foram injetados em camundongos em intervalos separados por 4 semanas. Quatorze dias após o reforço final, baços e soro foram coletados para analisar a resposta imune à HA. Um sumário desses experimentos é apresentado nas **Figuras 14A a 14C**. Nas **Figuras 14A a 14C**, um aumento em respostas de célula T e célula B foi observado com o uso de construtos contendo o motivo de DLP quando combinado com formulações de LNP (nanopartículas lipídicas catiônicas). Na **Figura 14A**, títulos IgG de HA específico total foram significativamente superiores em todos os grupos de dosagem com o uso de formulações de LNP comparados ao grupo com replicação administrado em soro fisiológico. Ademais, nas **Figuras 14B e 14C**, foi observado que células T CD8+ e CD4+ de HA específico também foram significativamente superiores em todos os grupos de dosagem com o uso de formulações de LNP comparados ao grupo com replicação administrado em soro fisiológico. Tomados em conjunto, esses dados demonstram que construtos

de replicação contendo o motivo de DLP são compatíveis com formulações representativas.

Exemplo 7

Prevenção de Supressão de Resposta Imune com o Uso de Replicões contendo DLP

[279] Replicões contendo DLP construídos como descrito acima foram adicionalmente avaliados in vivo para a capacidade de impedir supressão de resposta imune em camundongos Balb/c. Nesses experimentos, 1,5 µg de mRNA, com ou sem motivo de DLP, e carreando uma sequência de codificação para Hemaglutinina derivada de Influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) são injetados em camundongos em intervalos separados por 4 semanas. Aproximadamente 24 horas antes da injeção, camundongos BALB/c com 6 a 8 semana de idade são pré-tratados com 20 µg de Poli(I:C) ou soro fisiológico por injeção hidrodinâmica na veia caudal para simular uma infecção viral. Quatorze dias após o reforço final, soro desses camundongos é coletado para analisar a resposta imune à Hemaglutinina (HA). Um sumário desses experimentos é apresentado na Figura 13. Na Figura 13, uma diminuição significativa é observada na concentração sérica de anticorpos de HA específico em camundongos que foram pré-tratados com Poli(I:C) e receberam doses de replicões não modificados. Os níveis no grupo Poli(I:C) não foram significativamente acima dos antecedentes. Pelo contrário,

animais pré-tratados com Poli(I:C) e dosados com um construto contendo o motivo de DLP não mostraram reduções significativas em concentração de IgG total específica de antígeno de soro. Tomados em conjunto, esses dados mostram que o motivo de DLP protege contra supressão de níveis de anticorpo de soro em resposta à vacinação seguindo uma infecção viral simulada comparados à versão não modificada.

Exemplo 8

Construção de Cassetes de Expressão contendo DLP

[280] Esse Exemplo descreve a geração de um vetor de plasmídeo para transcrição *ex vitro* de um mRNA contendo um elemento de DLP de vírus de Sindbis a montante de um gene de interesse, por exemplo, um gene repórter, de acordo com algumas modalidades da revelação. As regiões não transladas 5' e 3' (UTR) usadas nesses experimentos (SEQ ID NO: 36 e SEQ ID NO: 41, respectivamente) foram derivadas do gene humano beta globina. A sequência de 5' UTR foi colocada imediatamente a jusante de um promotor T7 (SEQ ID NO: 37) e a montante da sequência de DLP de vírus de Sindbis (SEQ ID NO: 38). Em alguns experimentos, a sequência de codificação para um gene de interesse (GOI) foi ligada ao DLP por meio de um sinal P2A, que é um peptídeo de autoclivagem autocatalítico (por exemplo, peptídeo de auto-protease) derivado do tescovírus-1 porcino. Em alguns experimentos, uma sequência de codificação para uma forma

desestabilizada de gene repórter EGFP (dsGFP) que, nesse caso usado como um GOI, foi ligado de modo operável ao sinal de degradação de PEST proteolítico derivado de um gene da ornitina descarboxilase de camundongo (MODC). Em alguns outros experimentos, uma sequência de codificação do gene repórter de luciferase de Firefly vermelho foi usada como o gene de interesse (também consultar, Exemplo 9 abaixo). Entretanto, é contemplado que sequências de codificação para qualquer gene de interesse poderiam ser implantadas nessa configuração. Além disso, como ilustrado na Figura 15, uma sequência de 3' UTR derivada de beta globina humana, uma cauda poliA que consiste em resíduos de adenina 120, e um terminador T7 foram inseridos a jusante e adjacentes ao códon de parada de dsGFP. As sequências de ácido nucleico de cada um dos componentes descritos acima são como segue:

Tabela 9

Componentes de mRNAs de dsGFP de DLP	
UTR de globina beta humana 5'	5' - ACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCGCCGCCACC-3' (SEQ ID NO 36)
Promotor T7	5' -TAATACGACTCACTATAG-3' (SEQ ID NO 37)
Motivo de DLP	5' -ATAGTCAGCATAGTACATTTTCATCTGACTAATACTACAACACCACCACCATGAATAGAGGATTCTTTAACATGCTCGGCCGCCGC CCCTTCCCGGCCCCCACTGCCATGTGGAGGCCGCGGAGAAGGAGGCAGGCGGCCCG -3' (SEQ ID NO 38)
Peptídeo P2A	5' -GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT-3' (SEQ ID NO 39)
DsGFP	5' - ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAAC

	GGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCG ATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC ACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGT GACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCT ACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCC GCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTT CTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGG TGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAG CTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCT GGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAGCCACAACG TCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAG GTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAG CGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCA TCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTAC CTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGA GAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCG CCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAA GAAGCTTAGCCATGGCTTCCCGCCGGAGGTGGAGGAG CAGGATGATGGCACGCTGCCCATGTCTTGTGCCCAGGA GAGCGGGATGGACCGTCACCCTGCAGCCTGTGCTTCTG CTAGGATCAATGTGTAG -3' (SEQ ID NO 40)
UTR de globina beta humana 3'	5'-GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTTCCTTT GTTCCCTAAGTCCAACCTACTAACTGGGGGATATTATGAAGG GCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTT TCATTGCAA -3' (SEQ ID NO: 41)
Terminador T7	5'- AACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTTTTTT-3' (SEQ ID NO: 42)
Sequência de Mrna de dsGFP de DLP	5'-TAATACGACTCACTATAGACATTTGCTTCTGACAC AACTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCGC CGCCACCATAGTCAGCATAGTACATTTTCATCTGAC TAATACTACAACACCACCACCATGAATAGAGGATT CTTTAACATGCTCGGCCGCCGCCCTTCCCGGCCCC CACTGCCATGTGGAGGCCGCGGAGAAGGAGGCAGG CGGCCCCGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTG CTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGG ACCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCG GGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACG TAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAA GTTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTG GCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCA GTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCA CGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTC CAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAAC TACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGAC ACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGAC TTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTG

	GAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGG CCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCA AGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGC TCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCG ACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAG CACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAA GCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCC GCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGA AGCTTAGCCATGGCTTCCCGCCGGAGGTGGAGGAGCA GGATGATGGCACGCTGCCCATGTCTTGTGCCCAGGAG AGCGGGATGGACCGCTCACCCCTGCAGCCTGTGCTTCTG CTAGGATCAATGTGTAGGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAA TTTCTATTAAAGGTTCTTTGTTCCCTAAGTCCAATA CTAAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTG GATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTTT TTT -3' (SEQ ID NO: 43)
--	---

[281] Nos experimentos acima, foi usada uma sequência de DLP de vírus de Sindbis. Experimentos adicionais são realizados para incorporar sequências de DLP a partir de outros membros de alfavírus do Velho Mundo tais como SV, SFV, BEBV, RRV, SAG, GETV, MIDV, CHIKV e ONNV, nas moléculas de ácido nucleico da presente revelação. A ligação do DLP ao gene de interesse pode ser configurada com ou sem um peptídeo de autoclivagem tal como P2A. Sem ligação a qualquer teoria particular, acredita-se que a exigência para uma sequência 2A ou outro peptídeo de autoclivagem seja dependente do gene individual ser inserido no cassete de gene e se os aminoácidos adicionais adicionados pela inclusão de DLP afetariam a função de proteínas transladas. É contemplado

adicionalmente que as sequências de UTR 5' e 3' usadas aqui também possam ser mudadas para qualquer outro conjunto de UTRs funcionais independentemente de origem.

Exemplo 9

Avaliação *Ex vivo* de Expressão de Gene em Cassetes de Expressão contendo DLP

[282] mRNAs derivados de cassetes de expressão contendo DLP modificados para conter um ou mais motivos de DLP, como descrito acima, foram avaliados *ex vivo* para a capacidade de aprimorar expressão do gene de interesse em células BHK-21. Como controle, amostras de mRNA carentes da sequência de DLP, mas de outra forma idênticas aos mRNAs contendo DLP descritos acima foram submetidas a ensaio em paralelo sob as mesmas condições. Nesses experimentos, células BHK-21 foram pré-tratadas com 300, 600 ou 1.000 U/ml de interferon tipo I universal ou veículo de controle por 2 horas. Seguindo o pré-tratamento as células foram eletroporadas, em triplicata, com 2,5 µg de mRNA contendo ou carentes de motivos de DLP. As células foram colocadas de volta nos meios contendo as mesmas concentrações de interferon usadas durante o pré-tratamento. A frequência de células de GFP positivo e Intensidade de Fluorescência Média (MFI) foi submetida a ensaio em 2, 4 e 24 horas pós-eletroporação por citometria de fluxo. Foi observado que mRNA contendo DLP produz frequência significativamente

superior de células de GFP positivo comparado ao mRNA não DLP na presença de interferon (**Figura 16A**).

[283] Além disso, quando o MFI de GFP foi normalizado para a frequência de células de GFP positivo e plotadas em função do tempo, foi observado que o mRNA não modificado foi sensível a tratamento com interferon como exibido por uma redução significativa estatisticamente de 30% em proteína global produzida durante o curso de tempo de 24 horas (**Figura 16B**). Pelo contrário, o mRNA modificado contendo DLP demonstrou resistência a tratamento com interferon como exibido por um aumento estatisticamente significativo de 30% em produção global de proteína sobre o mRNA não modificado de controle durante o mesmo curso de tempo de 24 horas (**Figura 16C**). O tratamento de resistência a interferon conferido pela presença dos motivos de DLP foi fortalecido adicionalmente pela constatação de que células tratadas com interferon e eletroporadas com um mRNA contendo DLP produziu tanta proteína quanto células não tratadas eletroporadas com um mRNA não modificado (**Figura 16C**).

Exemplo 10

Avaliação In Vivo De Expressão De Gene Em Cassetes De Expressão Contendo Dlp

[284] mRNAs derivados de cassetes de expressão contendo DLP modificados para conter um ou mais motivos de DLP, como descrito acima, são avaliados adicionalmente *in*

vivo para a capacidade de aprimorar expressão do gene de interesse em camundongos Balb/c. Nesse experimento, 30 µg, 15 µg ou 1,5 µg de mRNA contendo DLP que codifica luciferase de Firefly vermelho são injetados em camundongos em intervalos separado por 6 semanas. A expressão de luciferase de Firefly vermelho é posteriormente monitorada por análise de IVIS (Sistema de Imageamento *In vivo*) em 1, 3, 7, 10, 14, 21 e 28 dias pós-injeção. Um aumento significativo em expressão de luciferase é observado em camundongos que recebem mRNAs contendo DLP quando comparado a animais de controle que recebem mRNA carente do motivo de DLP.

Exemplo 11

Prevenção de Supressão de Resposta Imune com o Uso de mRNAs Contendo DLP

[285] mRNAs contendo DLP como descrito acima são avaliados adicionalmente *in vivo* para a capacidade de aprimorar expressão do gene de interesse em camundongos Balb/c. Nesse experimento, 30 µg, 15 µg ou 1,5 µg de mRNA, com ou sem motivo de DLP, e carreando uma sequência de codificação para Hemaglutinina derivada de Influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) são injetados em camundongos em intervalos separados por 4 semanas. Aproximadamente 24 horas antes da injeção, camundongos são pré-tratados com 20 µg de Poli(I:C) ou soro fisiológico por injeção hidrodinâmica na veia caudal para simular uma infecção viral. Quatorze dias

após o reforço final, soro desses camundongos é coletado para analisar a resposta imune à Hemaglutinina (HA). É esperado que uma diminuição significativa na concentração sérica de anticorpos de HA específico seja observada em camundongos que são pré-tratados com Poli(I:C) e recebem uma dose de mRNA carente da sequência de DLP. Pelo contrário, espera-se que animais pré-tratados com Poli(I:C) e dosados com mRNA contendo o motivo de DLP não mostrem reduções significativas em concentração de IgG total de antígeno específico em soro.

[286] Embora alternativas particulares da presente revelação tenham sido reveladas, deve ser compreendido que várias modificações e combinações são possíveis e são contempladas dentro do verdadeiro espírito e escopo das reivindicações anexas. Não existe, portanto, intenção de limitações para ao exato resumo e revelação apresentados no presente documento.

[287] Todas as referências reveladas no presente documento, que incluem, porém, sem limitação, artigos de jornal, livros didáticos, publicações, patentes e pedidos de patente são incorporados em sua totalidade ao presente documento a título de referência na mesma medida se cada referência fosse específica e individualmente indicada para ser incorporada a título de referência.

[288] Nenhuma admissão é produzida de que qualquer

referência citada no presente documento constitui técnica anterior. A discussão das referências expressa o que os seus autores afirmam, e os inventores se reservam o direito de desafiar a precisão e pertinência dos documentos citados. Será claramente compreendido que, embora um número de fontes de informações, que incluem artigos de jornal científico, documentos de patente e livros didáticos, seja denominado no presente documento; qualquer discussão e comentário em uma fonte de informações específica deve não deve de forma alguma ser considerada como uma admissão de que tal comentário foi amplamente aceito como a opinião geral no campo.

[289] A discussão das composições e métodos gerais apresentada no presente documento é destinada apenas a propósitos ilustrativos. A mesma não se destina a ser exaustiva ou a limitar a revelação. Aspectos ou recursos individuais de uma modalidade particular não são, em geral, limitados àquela modalidade particular, mas, onde aplicável, são intercambiáveis e podem ser usados em uma modalidade selecionada, mesmo se não mostrado ou descrito especificamente. É contemplado expressamente que qualquer aspecto ou recurso da presente revelação possa ser combinado com qualquer outro aspecto, recursos ou combinação de aspectos e recursos revelados no presente documento. Outras composições, métodos, e modalidades alternativas ficarão aparentes para as pessoas versadas na técnica na revisão

dessa revelação, e devem ser incluídos no espírito e âmbito desse pedido.

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de Ácido Nucleico, compreendendo:

uma primeira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais *stem-loops* de RNA de um potenciador de capsídeo viral ou variante do mesmo; e

uma segunda sequência de ácido nucleico ligada de forma operacional à primeira sequência de ácido nucleico,

caracterizada por que a segunda sequência de ácido nucleico compreende uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI).

2. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada** por que a primeira sequência de ácido nucleico é ligada de forma operacional a montante à sequência de codificação para o GOI.

3. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** por que compreende ainda um promotor ligado de forma operacional a montante à primeira sequência de ácido nucleico.

4. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 3, **caracterizada** por que compreende ainda uma sequência da 5' UTR ligada de forma operacional a montante à primeira sequência de ácido nucleico.

5. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 4, **caracterizada** por que a sequência da 5' UTR é ligada de forma operacional a jusante ao promotor e a montante à primeira sequência de ácido nucleico.

6. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 5, **caracterizada** por que compreende ainda

uma sequência de codificação para um peptídeo autoprotease ligada de forma operacional a montante à segunda sequência de ácido nucleico.

7. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 6, **caracterizada** por que a sequência de codificação para o peptídeo autoprotease é ligada de forma operacional a jusante à primeira sequência de ácido nucleico e a montante à segunda sequência de ácido nucleico.

8. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 6 a 7, **caracterizada** por que o peptídeo autoprotease compreende uma sequência de peptídeo selecionada do grupo consistindo em teschovírus suíno-1 2A (P2A), um vírus da febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um vírus A da rinite equina (ERAV) 2A (E2A), um Thosa asigna virus 2A (T2A), vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A), um Flacherie Virus 2A (BmIFV2A) e uma combinação dos mesmos.

9. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 8, **caracterizada** por que compreende ainda uma sequência da 3' UTR ligada de forma operacional a jusante à segunda sequência de ácido nucleico.

10. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 9, **caracterizada** por que o potenciador de capsídeo viral é derivado de um gene de capsídeo de uma espécie de vírus pertencente à família *Togaviridae*.

11. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 10, **caracterizada** por que a espécie de vírus pertence ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*.

12. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 11, **caracterizada** por que a espécie de alphavirus é selecionada do grupo consistindo no vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV), vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), Everglades vírus (EVEV), Mucambo vírus (MUCV), Semliki forest vírus (SFC), Pixuna vírus, Middleburg vírus (MIDV), vírus Chicungunha (CHIKV), vírus O'Nyong-

Nyong (ONNV), Ross River virus (RRV), Barmah Forest virus (BF), Getah vírus (GET), Sagiya virus (SAGV), Bebaru virus (BEBV), Mayaro virus (MAYV), Una virus (UNAV), Sindbis virus (SINV), Aura virus (AURAV), Whataroa virus (WHAV), Babanki virus (BABV), Kyzylagach virus (KYZV), vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV), Highland J virus (HJV), Fort Morgan virus (FMV), Ndumu (NDUV), Salmonid alphavirus (SAV) e Buggy Creek virus.

13. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 10 a 12, **caracterizada** por que o potenciador de capsídeo viral compreende um motivo de *loop* a jusante (DLP) das espécies de vírus, e, em que, o motivo DLP compreende pelo menos um do um ou mais *stem-loops* de RNA.

14. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 11, **caracterizada** por que o potenciador de capsídeo viral compreende uma sequência de ácido nucleico apresentando pelo menos 80% de identidade de sequência com pelo menos um de SEQ ID Nos: 1 e 46-52.

15. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 14, **caracterizada** por que a sequência de ácido nucleico apresenta pelo menos 95% de identidade de sequência com pelo menos um de SEQ ID Nos: 1 e 46-52.

16. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 15, **caracterizada** por que a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo.

17. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 16, **caracterizada** por que o polipeptídeo é selecionado do grupo consistindo em um polipeptídeo terapêutico, um polipeptídeo profilático, um polipeptídeo de diagnóstico, um polipeptídeo nutracêutico, uma enzima industrial, um polipeptídeo repórter e uma combinação dos mesmos.

18. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 16, **caracterizada** por que o polipeptídeo é

selecionado do grupo consistindo em um anticorpo, um antígeno, um modulador imunológico, uma citocina, uma enzima e uma combinação dos mesmos.

19. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 18, compreendendo ainda:

uma terceira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais *stem-loops* de RNA de um segundo potenciador de capsídeo viral ou variante do mesmo; e

uma quarta sequência de ácido nucleico ligada de forma operacional à terceira sequência de ácido nucleico,

caracterizada por que a quarta sequência de ácido nucleico compreende uma sequência de codificação para um segundo gene de interesse (GOI).

20. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 19, **caracterizada** por que compreende ainda uma sequência de codificação para um segundo peptídeo autoprotease ligada de forma operacional a jusante à terceira sequência de ácido nucleico e a montante à quarta sequência de ácido nucleico.

21. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 20, **caracterizada** por que a molécula de ácido nucleico é uma molécula de mRNA ou um replicon de RNA.

22. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 20, **caracterizada** por que a molécula de ácido nucleico é um vetor de expressão ou um vetor de transcrição.

23. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 22, **caracterizada** por que compreende ainda uma ou mais sequências reguladoras de transcrição adicionais.

24. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 22 ou 23, **caracterizada** por que compreende ainda uma ou mais

seqüências reguladoras de tradução.

25. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 22 a 24, **caracterizada** por que a molécula de ácido nucleico é um plasmídeo, um vetor bacteriófago, um cosmídeo, um foscídeo, um replicon viral, um vetor *shuttle* ou uma combinação dos mesmos.

26. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 22 a 25, **caracterizada** por que a molécula de ácido nucleico é um vetor procariótico ou um vetor eucariótico.

27. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1 a 26, **caracterizada** por que a molécula de ácido nucleico é produzida por meio de síntese *de novo*.

28. Método Para Produção de Polipeptídeo de Interesse em Célula, **caracterizado** por que compreende a introdução de uma molécula de ácido nucleico, conforme definida em qualquer uma das Reivindicações de 16 a 27, em uma célula, produzindo um polipeptídeo codificado pelo GOI na célula.

29. Método Para Produção de Polipeptídeo de Interesse em Célula, compreendendo a introdução de uma molécula de RNA dentro da célula, **caracterizado** por que a molécula de RNA compreende um ou mais *stem-loops* de RNA de um potenciador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo e uma sequência de codificação para o polipeptídeo de interesse, produzindo o polipeptídeo de interesse na célula.

30. Método Para Produção de Polipeptídeo de Interesse em Célula, de acordo com a Reivindicação 29, **caracterizado** por que a molécula de RNA é uma molécula de RNA mensageiro (mRNA) ou uma molécula de RNA replicon.

31. Método Para Produção de Polipeptídeo de Interesse em Célula, de acordo com a Reivindicação 29 ou 30, **caracterizado** por que a molécula de RNA é produzida por meio de síntese *de novo* e/ou transcrição *in vitro*, antes de ser introduzida dentro da célula.

32. Método Para Produção de Polipeptídeo de Interesse em

Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 29 a 31, **caracterizado** por que a molécula de RNA compreende um motivo de *loop* a jusante (DLP) de uma espécie de vírus e em que o motivo de DLP compreende pelo menos um do um ou mais *stem-loops* de RNA do potenciador de capsídeo viral.

33. Método Para Produção de Polipeptídeo de Interesse em Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 29 a 32, **caracterizado** por que a molécula de RNA compreende ainda uma sequência de codificação para um peptídeo autoprotease a jusante em relação a pelo menos um do um ou mais *stem-loops* de RNA e a montante à sequência de codificação para o polipeptídeo de interesse.

34. Método Para Produção de Polipeptídeo de Interesse em Célula, de acordo com a Reivindicação 33, **caracterizado** por que o peptídeo autoprotease compreende uma sequência de peptídeo selecionada do grupo consistindo em teschovírus suíno-1 2A (P2A), um vírus da febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um vírus A da rinite equina (ERAV) 2A (E2A), um Thosa asigna virus 2A (T2A), vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A), um Flacherie Virus 2A (BmIFV2A) e uma combinação dos mesmos.

35. Método Para Produção de Polipeptídeo de Interesse em Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 29 a 34, **caracterizado** por que o polipeptídeo é selecionado do grupo consistindo em um polipeptídeo terapêutico, um polipeptídeo profilático, um polipeptídeo de diagnóstico, um polipeptídeo nutracêutico, uma enzima industrial, um polipeptídeo repórter e uma combinação dos mesmos.

36. Método Para Produção de Polipeptídeo de Interesse em Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 29 a 34, **caracterizado** por que o polipeptídeo é selecionado do grupo consistindo em um anticorpo, um antígeno, um modulador imunológico, uma citocina, uma enzima e uma combinação dos mesmos.

37. Método Para Produção de Polipeptídeo de Interesse em Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 29 a 36, **caracterizado** por que a célula está presente em um tecido, um órgão ou um indivíduo.

38. Método Para Produção de Polipeptídeo de Interesse em Célula, de acordo com a Reivindicação 37, **caracterizado** por que o indivíduo é selecionado do grupo consistindo em humano, cavalo, porco, primata, camundongo, furão, rato, rato-do-algodão, gado, suíno, ovelha, coelho, gato, cachorro, pássaro, peixe, cabra, jumento, hamster e búfalo.

39. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, compreendendo a administração à célula de uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma primeira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais *stem-loops* de RNA de um potenciador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo e uma segunda sequência de ácido nucleico ligada de forma operacional à primeira sequência de ácido nucleico, **caracterizado** por que a segunda sequência de ácido nucleico compreende uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI), produzindo, assim, um mRNA do GOI.

40. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com a Reivindicação 39, **caracterizado** por que a primeira sequência de ácido nucleico é ligada de forma operacional a montante à sequência de codificação para o GOI.

41. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com a Reivindicação 39 ou 40, **caracterizado** por que compreende ainda um promotor ligado de forma operacional a montante à primeira sequência de ácido nucleico.

42. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 39 a 41, **caracterizado** por que compreende ainda uma sequência da 5' UTR ligada de forma operacional a montante à primeira sequência de ácido nucleico.

43. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com a Reivindicação 42, **caracterizado** por que a sequência da 5' UTR é ligada de forma operacional a jusante ao promotor e a montante à primeira sequência de ácido nucleico.

44. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 39 a 43, **caracterizado** por que compreende ainda uma sequência de codificação para um peptídeo autoprotease ligada de forma operacional a montante à segunda sequência de ácido nucleico.

45. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com a Reivindicação 44, **caracterizado** por que a sequência de codificação para o peptídeo autoprotease é ligada de forma operacional a jusante à primeira sequência de ácido nucleico e a montante à segunda sequência de ácido nucleico.

46. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 44 a 45, **caracterizado** por que o peptídeo autoprotease compreende uma sequência de peptídeo selecionada do grupo consistindo em teschovírus suíno-1 2A (P2A), um vírus da febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um vírus A da rinite equina (ERAV) 2A (E2A), um Thosa asigna virus 2A (T2A), vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A), um Flacherie Virus 2A (BmIFV2A) e uma combinação dos mesmos.

47. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 39 a 46, **caracterizada** por que compreende ainda uma sequência da 3' UTR ligada de forma operacional a jusante à segunda sequência de ácido nucleico.

48. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 39 a 47, **caracterizado** por que o potenciador de capsídeo viral é derivado de um gene de capsídeo de uma espécie de vírus pertencente à família *Togaviridae*.

49. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em

Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 39 a 48, **caracterizado** por que a espécie de vírus pertence ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*.

50. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com a Reivindicação 49, **caracterizado** por que a espécie de alphavirus é selecionada do grupo consistindo no vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV), vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), Everglades vírus (EVEV), Mucambo vírus (MUCV), Semliki forest vírus (SFC), Pixuna vírus, Middleburg vírus (MIDV), vírus Chicungunha (CHIKV), vírus O'Nyong-Nyong (ONNV), Ross River virus (RRV), Barmah Forest virus (BF), Getah vírus (GET), Sagiya virus (SAGV), Bebaru virus (BEBV), Mayaro virus (MAYV), Una virus (UNAV), Sindbis virus (SINV), Aura virus (AURAV), Whataroa virus (WHAV), Babanki vírus (BABV), Kyzylagach virus (KYZV), vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV), Highland J virus (HJV), Fort Morgan virus (FMV), Ndumu (NDUV), Salmonid alphavirus (SAV) e Buggy Creek virus.

51. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 48 a 50, **caracterizado** por que o potenciador de capsídeo viral compreende um motivo de *loop* a jusante (DLP) das espécies de vírus, e, em que, o motivo DLP compreende pelo menos um do um ou mais *stem-loops* de RNA.

52. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com a Reivindicação 51, **caracterizado** por que o potenciador de capsídeo viral compreende uma sequência de ácido nucleico apresentando pelo menos 80% de identidade de sequência com pelo menos um de SEQ ID N^{os}: 1 e 46-52.

53. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 52, **caracterizada** por que a sequência de ácido nucleico apresenta pelo menos 95% de identidade de sequência com pelo menos um de SEQ ID N^{os}: 1 e 46-52.

54. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em

Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 39 a 53, **caracterizado** por que a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo.

55. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com a Reivindicação 54, **caracterizado** por que o polipeptídeo é selecionado do grupo consistindo em um polipeptídeo terapêutico, um polipeptídeo profilático, um polipeptídeo de diagnóstico, um polipeptídeo nutracêutico, uma enzima industrial, um polipeptídeo repórter e uma combinação dos mesmos.

56. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com a Reivindicação 54, **caracterizado** por que o polipeptídeo é selecionado do grupo consistindo em um anticorpo, um antígeno, um modulador imunológico, uma citocina, uma enzima e uma combinação dos mesmos.

57. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 39 a 56, ainda compreendendo:

uma terceira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais *stem-loops* de RNA de um segundo potenciador de capsídeo viral ou variante do mesmo; e

uma quarta sequência de ácido nucleico ligada de forma operacional à terceira sequência de ácido nucleico,

caracterizado por que a quarta sequência de ácido nucleico compreende uma sequência de codificação para um segundo gene de interesse (GOI).

58. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com a Reivindicação 57, **caracterizado** por que compreende ainda uma sequência de codificação para um segundo peptídeo autoprotease ligada de forma operacional a jusante à terceira

sequência de ácido nucleico e a montante à quarta sequência de ácido nucleico.

59. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 39 a 58, **caracterizado** por que a molécula de ácido nucleico é um replicon de RNA.

60. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 39 a 58, **caracterizado** por que a molécula de ácido nucleico é um vetor de expressão ou um vetor de transcrição.

61. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com a Reivindicação 59 ou 60, **caracterizado** por que a molécula de ácido nucleico ainda compreende uma ou mais sequências reguladoras de transcrição adicionais.

62. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 60 ou 61, **caracterizada** por que compreende ainda uma ou mais sequências reguladoras de tradução.

63. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 60 a 62, **caracterizado** por que a molécula de ácido nucleico é um vetor de expressão selecionado do grupo consistindo em um plasmídeo, um vetor bacteriófago, um cosmídeo, um fosmídeo, um replicon viral, um vetor *shuttle*, ou uma combinação dos mesmos.

64. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 60 a 62, **caracterizado** por que a molécula de ácido nucleico é um vetor procariótico ou um vetor de expressão eucariótico.

65. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 39 a 64, **caracterizado** por que a célula está presente em um tecido, um órgão ou um indivíduo.

66. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em

Célula, de acordo com a Reivindicação 65, **caracterizado** por que o indivíduo é selecionado do grupo consistindo em humano, cavalo, porco, primata, camundongo, furão, rato, rato-do-algodão, gado, suíno, ovelha, coelho, gato, cachorro, pássaro, peixe, cabra, jumento, hamster e búfalo.

67. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 39 a 66, **caracterizado** por que compreende ainda a produção de um polipeptídeo codificado pelo mRNA do GOI na célula.

68. Método Para a Produção de RNA Mensageiro (mRNA) em Célula, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 39 a 66, **caracterizado** por que compreende ainda:

obter o mRNA produzido do GOI;

introduzir o mRNA obtido dentro de uma segunda célula para expressão de um polipeptídeo codificado pelo mRNA do GOI na segunda célula.

69. Molécula de Ácido Nucleico, compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando um replicon de RNA viral modificado, **caracterizada** por que o replicon de RNA viral modificado compreende:

uma primeira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais elementos estruturais de um potenciador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo, em que o potenciador de capsídeo viral é heterólogo em relação ao replicon de RNA viral, e

uma segunda sequência de ácido nucleico codificando pelo menos uma proteína viral não estrutural ou uma parte do mesmo,

em que a primeira sequência de ácido nucleico é ligada de forma operacional a montante à segunda sequência de ácido nucleico.

70. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 69, **caracterizada** por que pelo menos um de um ou mais elementos estruturais do potenciador de capsídeo viral compreende um ou mais *stem-loops* de RNA.

71. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 69 ou 70, **caracterizada** por que o potenciador de capsídeo viral é derivado a partir de um gene de capsídeo de uma espécie de vírus pertencente à família *Togaviridae*.

72. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 71, **caracterizada** por que a espécie de vírus pertence ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*.

73. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 72, **caracterizada** por que a espécie de alphavirus é selecionada do grupo consistindo no vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV), vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), Everglades vírus (EVEV), Mucambo vírus (MUCV), Semliki forest vírus (SFC), Pixuna vírus, Middleburg vírus (MIDV), vírus Chicungunha (CHIKV), vírus O'Nyong-Nyong (ONNV), Ross River virus (RRV), Barmah Forest virus (BF), Getah vírus (GET), Sagiya virus (SAGV), Bebaru virus (BEBV), Mayaro virus (MAYV), Una virus (UNAV), Sindbis virus (SINV), Aura virus (AURAV), Whataroa virus (WHAV), Babanki vírus (BABV), Kyzylagach virus (KYZV), vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV), Highland J virus (HJV), Fort Morgan virus (FMV), Ndumu (NDUV) e Buggy Creek virus.

74. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 71 a 73, **caracterizada** por que o potenciador de capsídeo viral compreende um motivo de *loop* a jusante (DLP) das espécies de vírus, e, em que, o motivo DLP compreende pelo menos um do um ou mais *stem-loops* de RNA.

75. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 69 ou 70, **caracterizada** por que o potenciador de capsídeo viral compreende uma sequência de ácido nucleico apresentando pelo menos 80% de identidade de sequência com pelo menos um de SEQ ID Nos: 1 e

46-52.

76. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 75, **caracterizada** por que a sequência de ácido nucleico apresenta pelo menos 95% de identidade de sequência com pelo menos um de SEQ ID Nos: 1 e 46-52.

77. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 69 a 76, **caracterizada** por que a sequência de ácido nucleico codificando o replicon de RNA viral modificado ainda compreendendo uma sequência de codificação para um peptídeo autoprotease ligado de forma operacional a jusante à primeira sequência de ácido nucleico e a montante à segunda sequência de ácido nucleico.

78. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 77, **caracterizada** por que o peptídeo autoprotease compreende uma sequência de peptídeo selecionada do grupo consistindo em teschovírus suíno-1 2A (P2A), um vírus da febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um vírus A da rinite equina (ERAV) 2A (E2A), um Thovirus asinigena vírus 2A (T2A), vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A), um Flacherie Virus 2A (BmIFV2A), ou uma combinação dos mesmos.

79. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 69 a 78, **caracterizada** por que a primeira sequência de ácido nucleico é posicionada de forma operacional dentro de uma região de cerca de 1 a 1.000 nucleotídeos a jusante da terminação 5' do replicon de RNA viral modificado.

80. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 69 a 79, **caracterizada** por que a segunda sequência de ácido nucleico compreende substancialmente toda a sequência de codificação para as proteínas não estruturais virais nativas do replicon de RNA viral não modificado correspondente.

81. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 69 a 80, **caracterizada** por que o replicon de RNA viral modificado compreende um replicon de RNA modificado derivado

de uma espécie de vírus pertencente ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae* ou ao gênero *Arterivirus* da família *Arteriviridae*.

82. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 81, **caracterizada** por que a espécie de vírus arterivirus é selecionada do grupo consistindo em vírus da arterite Equina (EAV), vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV), vírus elevador da desidrogenase láctica (LDV) e vírus da febre hemorrágica símia (SHFV).

83. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 82, **caracterizada** por que a primeira sequência de ácido nucleico é posicionada de forma operável a montante a uma segunda sequência de ácido nucleico codificando uma parte ou toda a proteína não estrutural p1ab do replicon de RNA de arterivírus modificada.

84. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 82 ou 83, **caracterizada** por que a sequência de ácido nucleico codificando o replicon de RNA de arterivírus modificado ainda compreendendo um ou mais cassetes de expressão, em que pelo menos um dos um ou mais cassetes de expressão compreende um promotor ligado de forma operacional a uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI).

85. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 84, **caracterizada** por que o replicon de RNA de arterivírus modificado compreende pelo menos dois, três, quatro, cinco ou seis cassetes de expressão.

86. Molécula de Ácido Nucleico, das Reivindicações 84 ou 85, **caracterizada** por que pelo menos um dos um ou mais cassetes de expressão é ligado de forma operacional a jusante da segunda sequência de ácido nucleico codificando uma parte de ou toda a proteína não estrutural p1ab do replicon de RNA de arterivírus modificado.

87. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 84 a 86, **caracterizada** por que pelo menos um

de um ou mais cassetes de expressão é posicionado de forma operacional a jusante a uma sequência regulatória transcricional (TRS) do replicon de RNA de arterivírus modificado, em que a TRS é selecionada do grupo consistindo em TRS1, TRS2, TRS3, TRS4, TRS5, TRS6 e TRS7.

88. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 84 a 87, **caracterizada** por que pelo menos um de um ou mais cassetes de expressão ainda compreende uma terceira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais elementos estruturais de um potenciador de capsídeo viral, em que a terceira sequência de ácido nucleico é ligada de forma operacional a montante à sequência de codificação para o GOI.

89. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 88, **caracterizada** por que a sequência de ácido nucleico codificando o replicon de RNA de arterivírus modificado ainda compreende uma sequência de codificação para um peptídeo autoprotease ligado de forma operacional a jusante à terceira sequência de ácido nucleico e a montante à sequência de codificação para o GOI.

90. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 84 a 89, **caracterizada** por que a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo selecionado do grupo consistindo em um polipeptídeo terapêutico, um polipeptídeo profilático, um polipeptídeo de diagnóstico, um polipeptídeo nutracêutico, uma enzima industrial, um polipeptídeo repórter e qualquer combinação dos mesmos.

91. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 84 a 89, **caracterizada** por que a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo selecionado do grupo consistindo em um anticorpo, um antígeno, um modulador imunológico, uma citocina, uma enzima e qualquer combinação dos mesmos.

92. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma

das Reivindicações de 69 a 91, **caracterizada** por que o replicon de RNA viral modificado compreende um replicon de RNA modificado derivado de uma espécie de vírus alphavirus selecionada do grupo consistindo em vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV), vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), Everglades vírus (EVEV), Mucambo vírus (MUCV), Semliki forest vírus (SFC), Pixuna vírus, Middleburg vírus (MIDV), vírus Chicungunha (CHIKV), vírus O'Nyong-Nyong (ONNV), Ross River virus (RRV), Barmah Forest virus (BF), Getah vírus (GET), Sagiyama virus (SAGV), Bebaru virus (BEBV), Mayaro virus (MAYV), Una virus (UNAV), Sindbis virus (SINV), Aura virus (AURAV), Whataroa virus (WHAV), Babanki virus (BABV), Kyzylagach virus (KYZV), vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV), Highland J virus (HJV), Fort Morgan virus (FMV), Ndumu (NDUV), Salmonid alphavirus (SAV) e Buggy Creek virus.

93. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 92, **caracterizada** por que a primeira sequência de ácido nucleico é posicionada de forma operacional a montante a uma segunda sequência de ácido nucleico codificando uma ou mais proteínas não estruturais nsp1-4 ou uma parte das mesmas do replicon de RNA de alphavirus modificado.

94. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 92 ou 93, **caracterizada** por que a sequência de ácido nucleico codificando o replicon de RNA de alphavirus modificado ainda compreende um ou mais cassetes de expressão, em que cada um dos cassetes de expressão compreende um promotor ligado de forma operacional a uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI).

95. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 94, **caracterizada** por que o replicon de RNA de alphavirus modificado compreende pelo menos dois, três, quatro, cinco ou seis cassetes de expressão.

96. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação

94 ou 95, **caracterizada** por que pelo menos um de um ou mais cassetes de expressão é ligado de forma operacional a jusante de uma sequência de ácido nucleico codificando uma ou mais proteínas não estruturais nsp1-4 ou uma parte das mesmas do replicon de RNA de alphavirus modificado.

97. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 94 a 96, **caracterizada** por que pelo menos um de um ou mais cassetes de expressão ainda compreende uma terceira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais elementos estruturais de um potenciador de capsídeo viral, em que a terceira sequência de ácido nucleico é ligada de forma operacional a montante da sequência de codificação para o GOI.

98. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 97, **caracterizada** por que a sequência de ácido nucleico codificando o replicon de RNA de alphavirus modificado ainda compreende uma sequência de codificação para um peptídeo autoprotease ligado de forma operacional a jusante à terceira sequência de ácido nucleico e a montante à sequência de codificação para o GOI.

99. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 94 a 98, **caracterizada** por que a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo selecionado do grupo consistindo em um polipeptídeo terapêutico, um polipeptídeo profilático, um polipeptídeo de diagnóstico, um polipeptídeo nutracêutico, uma enzima industrial e um polipeptídeo repórter.

100. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 94 a 98, **caracterizada** por que a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo selecionado do grupo consistindo em um anticorpo, um antígeno, um modulador imunológico, uma enzima e uma citocina.

101. Molécula de Ácido Nucleico, compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando um replicon de RNA de não-alphavirus modificado, **caracterizada** por que o replicon de RNA de não-alphavirus

modificado compreende uma primeira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais elementos estruturais de um potenciador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo.

102. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 101, **caracterizada** por que a sequência de ácido nucleico codificando o replicon de RNA de não-alphavirus modificado ainda compreende uma segunda sequência de ácido nucleico codificando pelo menos uma proteína viral não estrutural ou uma parte da mesma, em que a primeira sequência de ácido nucleico é ligada de forma operacional a montante à segunda sequência de ácido nucleico.

103. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 101 ou 102, a sequência de ácido nucleico codificando o replicon de RNA de não-alphavirus modificado, **caracterizada** por que compreende ainda uma sequência de codificação para um peptídeo autoprotease ligado de forma operacional a jusante à primeira sequência de ácido nucleico e a montante à segunda sequência de ácido nucleico.

104. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 103, **caracterizada** por que o peptídeo autoprotease compreende uma sequência de peptídeo selecionada do grupo consistindo em teschovírus suíno-1 2A (P2A), um vírus da febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um vírus A da rinite equina (ERAV) 2A (E2A), um Thosa asigna virus 2A (T2A), vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A), um Flacherie Virus 2A (BmIFV2A) e uma combinação dos mesmos.

105. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 101 a 104, **caracterizada** por que a sequência de ácido nucleico codificando o replicon de RNA de não-alphavirus modificado compreende um replicon de RNA modificado derivado de um vírus de RNA de filamento positivo.

106. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 105, **caracterizada** por que o vírus de RNA de filamento positivo é uma espécie de vírus pertencente a uma família selecionada do grupo consistindo na família *Togaviridae*, família *Flaviviridae*, família

Orthomyxoviridae, família *Rhabdoviridae* e família *Paramyxoviridae*.

107. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 106, **caracterizada** por que a espécie de vírus pertence ao gênero *Arterivirus* da família *Arteriviridae*.

108. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 101 a 107, **caracterizada** por que a sequência de ácido nucleico codificando o replicon de RNA de não-alphavirus modificado ainda compreendendo um ou mais cassetes de expressão, em que cada um dos cassetes de expressão compreende um promotor ligado de forma operacional a uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI).

109. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 101 a 108, **caracterizada** por que a sequência de ácido nucleico codificando o replicon de RNA de não-alphavirus modificado compreende pelo menos dois, três, quatro, cinco, ou seis cassetes de expressão.

110. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 101 a 109, **caracterizada** por que pelo menos um de um ou mais cassetes de expressão é ligado de forma operacional a jusante da segunda sequência de ácido nucleico codificando a pelo menos uma proteína viral não estrutural ou uma parte da mesma.

111. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 101 a 110, **caracterizada** por que pelo menos um de um ou mais cassetes de expressão ainda compreende uma terceira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais elementos estruturais de um potenciador de capsídeo viral, em que a terceira sequência de ácido nucleico é ligada de forma operacional a montante à sequência de codificação para o GOI.

112. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com a Reivindicação 111, **caracterizada** por que a sequência de ácido nucleico codificando o replicon de RNA de não-alphavirus modificado ainda compreendendo uma sequência de codificação para um peptídeo autoprotease ligado de

forma operacional a jusante à terceira sequência de ácido nucleico e a montante à sequência de codificação para o GOI.

113. Molécula de Ácido Nucleico, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 1-26 e 69-112, **caracterizada** por que a molécula de ácido nucleico é produzida por meio de síntese *de novo*.

114. Célula Recombinante, **caracterizada** por que compreende uma molécula de ácido nucleico conforme definida em qualquer uma das Reivindicações de 1-27 e 69-113.

115. Célula Recombinante, de acordo com a Reivindicação 114, **caracterizada** por que a célula recombinante é uma célula procariótica ou uma célula eucariótica.

116. Célula Recombinante, de acordo com a Reivindicação 114, **caracterizada** por que a célula recombinante é uma célula animal.

117. Célula Recombinante, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 114 a 116, **caracterizada** por que a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de ácido nucleico codificando um replicon de RNA modificado e em que a expressão do RNA de replicon modificado confere uma resistência a resposta imunológica inata na célula recombinante.

118. Cultura Celular, **caracterizada** por que compreende uma célula recombinante conforme definida em qualquer uma das Reivindicações de 114 a 117.

119. Método Para Conferir Resistência ao Sistema Imunológico Inato em Indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico, que codifica um replicon de RNA viral modificado, **caracterizado** por que o replicon de RNA viral modificado compreende:

uma primeira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais elementos estruturais de um potenciador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo, em que o potenciador de capsídeo viral é heterólogo ao replicon de RNA viral, e

uma segunda sequência de ácido nucleico codificando pelo menos uma proteína não estrutural ou uma parte da mesma,

em que a primeira sequência de ácido nucleico é ligada de forma operacional a montante à segunda sequência de ácido nucleico, e, em que a expressão do RNA de replicon modificado codificado pela molécula de ácido nucleico confere uma resistência à resposta imunológica inata no indivíduo.

120. Método Para Produção de Polipeptídeo de Interesse em Indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico que codifica um replicon de RNA viral modificado, **caracterizado** por que o replicon de RNA viral modificado compreende:

uma primeira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais elementos estruturais de um potenciador de capsídeo viral ou uma variante do mesmo, em que o potenciador de capsídeo viral é heterólogo ao replicon de RNA viral, e

uma segunda sequência de ácido nucleico codificando pelo menos uma proteína não estrutural ou uma parte da mesma,

em que a primeira sequência de ácido nucleico é ligada de forma operacional a montante à segunda sequência de ácido nucleico.

121. Método Para Produção de Polipeptídeo de Interesse, compreendendo o cultivo de uma célula hospedeira compreendendo uma molécula de ácido nucleico que compreende uma sequência de ácido nucleico codificando um replicon de RNA viral modificado, **caracterizado** por que o replicon de RNA viral modificado compreende:

uma primeira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais elementos estruturais de um potenciador de capsídeo viral ou

uma variante do mesmo, em que o potenciador de capsídeo viral é heterólogo ao replicon de RNA viral, e

uma segunda sequência de ácido nucleico codificando pelo menos uma proteína não estrutural ou uma parte da mesma,

em que a primeira sequência de ácido nucleico é ligada de forma operacional a montante à segunda sequência de ácido nucleico.

122. Método, de acordo com a Reivindicação 119 ou 120, **caracterizado** por que o indivíduo é selecionado do grupo consistindo em humano, cavalo, porco, primata, camundongo, furão, rato, rato-do-algodão, gado, suíno, ovelha, coelho, gato, cachorro, pássaro, peixe, cabra, jumento, hamster e búfalo.

123. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 119 a 122, **caracterizado** por que pelo menos um de um ou mais elementos estruturais do potenciador de capsídeo viral compreende um ou mais *stem-loops* de RNA.

124. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 119 a 123, **caracterizado** por que o potenciador de capsídeo viral é derivado de um gene de capsídeo de uma espécie de vírus pertencente à família *Togaviridae*.

125. Método, de acordo com a Reivindicação 124, **caracterizado** por que a espécie de vírus pertence ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae*.

126. Método, de acordo com a Reivindicação 125, **caracterizado** por que a espécie de alphavirus é selecionada do grupo consistindo no vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV), vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), Everglades vírus (EVEV), Mucambo vírus (MUCV), Semliki forest vírus (SFC), Pixuna vírus, Middleburg vírus (MIDV), vírus Chicungunha (CHIKV), vírus O'Nyong-Nyong (ONNV), Ross River virus (RRV), Barmah Forest virus (BF), Getah vírus (GET), Sagiya virus (SAGV), Bebaru virus (BEBV), Mayaro virus (MAYV), Una virus (UNAV),

Sindbis virus (SINV), Aura virus (AURAV), Whataroa virus (WHAV), Babanki vírus (BABV), Kyzylagach virus (KYZV), vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV), Highland J virus (HJV), Fort Morgan virus (FMV), Ndumu (NDUV) e Buggy Creek virus.

127. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 124 a 126, **caracterizado** por que o potenciador de capsídeo viral compreende um motivo de *loop* a jusante (DLP) da espécie de vírus e em que o motivo de DLP compreende pelo menos um de um ou mais *stem-loops* de RNA.

128. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 119 a 127, **caracterizado** por que o potenciador de capsídeo viral compreende uma sequência de ácido nucleico apresentando pelo menos 80% de identidade de sequência com pelo menos um de SEQ ID N^{os}: 1 e 46-52.

129. Método, de acordo com a Reivindicação 128, **caracterizado** por que a sequência de ácido nucleico apresenta pelo menos 95% de identidade de sequência com pelo menos um de SEQ ID N^{os}: 1 e 46-52.

130. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 119 a 129, **caracterizado** por que a sequência de ácido nucleico codificando o replicon de RNA viral modificado ainda compreendendo uma sequência de codificação para um peptídeo autoprotease ligado de forma operacional a jusante à primeira sequência de ácido nucleico e a montante à segunda sequência de ácido nucleico.

131. Método, de acordo com a Reivindicação 130, **caracterizado** por que o peptídeo autoprotease compreende uma sequência de peptídeo selecionada do grupo consistindo em teschovírus suíno-1 2A (P2A), um vírus da febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um vírus A da rinite equina (ERAV) 2A (E2A), um Thosea asigna virus 2A (T2A), vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A), um Flacherie Virus 2A (BmIFV2A), ou uma combinação dos mesmos.

132. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 119 a 131, **caracterizado** por que a primeira sequência de ácido

nucleico é posicionada de forma operacional dentro de uma região de cerca de 1 a 1000 nucleotídeos a jusante da terminação 5' do replicon de RNA viral modificado.

133. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 119 a 132, **caracterizado** por que a segunda sequência de ácido nucleico compreende substancialmente toda a sequência de codificação para as proteínas não estruturais virais nativas do replicon de RNA viral não modificado correspondente.

134. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 119 a 133, **caracterizado** por que o replicon de RNA viral modificado compreende um replicon de RNA modificado derivado de uma espécie de vírus pertencente ao gênero *Alphavirus* da família *Togaviridae* ou ao gênero *Arterivirus* da família *Arteriviridae*.

135. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 119 a 134, **caracterizado** por que a espécie de vírus arterivirus é selecionada do grupo consistindo em vírus da arterite Equina (EAV), vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV), vírus elevador da desidrogenase láctica (LDV) e vírus da febre hemorrágica símia (SHFV).

136. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 134 a 135, **caracterizado** por que a espécie de vírus é um arterivirus e em que a primeira sequência de ácido nucleico é posicionada de forma operável a montante a uma segunda sequência de ácido nucleico codificando uma parte ou toda a proteína não estrutural p1ab do replicon de RNA de arterivirus modificada.

137. Método, de acordo com a Reivindicação 136, **caracterizado** por que a sequência de ácido nucleico codificando o replicon de RNA de arterivirus modificado ainda compreende um ou mais cassetes de expressão, em que pelo menos um dos cassetes de expressão compreende um promotor ligado de forma operacional a uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI).

138. Método, de acordo com a Reivindicação 137, **caracterizado**

por que o replicon de RNA de arterivírus modificado ainda compreende pelo menos dois, três, quatro, cinco ou seis cassetes de expressão.

139. Método, de acordo com a Reivindicação 137, **caracterizado** por que pelo menos um de um ou mais cassetes de expressão é ligado de forma operacional a jusante da segunda sequência de ácido nucleico codificando uma parte de ou toda a proteína não estrutural pplab do replicon de RNA de arterivírus modificado.

140. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 137 a 139, **caracterizado** por que pelo menos um de um ou mais cassetes de expressão é posicionado de forma operacional a jusante a uma sequência regulatória transcricional (TRS) do replicon de RNA de arterivírus modificado, em que a TRS é selecionada do grupo consistindo em TRS1, TRS2, TRS3, TRS4, TRS5, TRS6 e TRS7.

141. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 137 a 140, **caracterizado** por que pelo menos um de um ou mais cassetes de expressão ainda compreende uma terceira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais elementos estruturais de um potenciador de capsídeo viral, em que a terceira sequência de ácido nucleico é ligada de forma operacional a montante à sequência de codificação para o GOI.

142. Método, de acordo com a Reivindicação 141, **caracterizado** por que a sequência de ácido nucleico codificando o replicon de RNA de arterivírus modificado ainda compreendendo uma sequência de codificação para um peptídeo autoprotease ligado de forma operacional a jusante à terceira sequência de ácido nucleico e a montante à sequência de codificação para o GOI.

143. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 137 a 142, **caracterizado** por que a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo selecionado do grupo consistindo em um polipeptídeo terapêutico, um polipeptídeo profilático, um polipeptídeo de diagnóstico, um polipeptídeo nutracêutico, uma enzima industrial, um polipeptídeo repórter e qualquer combinação dos mesmos.

144. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 137 a 142, **caracterizado** por que a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo selecionado do grupo consistindo em um anticorpo, um antígeno, um modulador imunológico, uma citocina, uma enzima e qualquer combinação dos mesmos.

145. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 119 a 134, **caracterizado** por que o replicon de RNA viral modificado compreende um replicon de RNA modificado derivado de uma espécie de vírus alphavirus selecionada do grupo consistindo em vírus da Encefalite Equina do Leste (EEEV), vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV), Everglades vírus (EVEV), Mucambo vírus (MUCV), Semliki forest vírus (SFC), Pixuna vírus, Middleburg vírus (MIDV), vírus Chicungunha (CHIKV), vírus O'Nyong-Nyong (ONNV), Ross River virus (RRV), Barmah Forest virus (BF), Getah vírus (GET), Sagiya virus (SAGV), Bebaru virus (BEBV), Mayaro virus (MAYV), Una virus (UNAV), Sindbis virus (SINV), Aura virus (AURAV), Whataroa virus (WHAV), Babanki virus (BABV), Kyzylagach virus (KYZV), vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV), Highland J virus (HJV), Fort Morgan virus (FMV), Ndumu (NDUV), Salmonid alphavirus (SAV) e Buggy Creek virus.

146. Método, de acordo com a Reivindicação 145, **caracterizado** por que a primeira sequência de ácido nucleico é posicionada de forma operacional a montante a uma sequência de ácido nucleico codificando uma ou mais proteínas não estruturais nsp1-4 ou uma parte das mesmas do replicon de RNA de alphavirus modificado.

147. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 145 a 146, **caracterizado** por que a sequência de ácido nucleico codificando o replicon de RNA de alphavirus modificado ainda compreende um ou mais cassetes de expressão, em que cada um dos cassetes de expressão compreende um promotor ligado de forma operacional a uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI).

148. Método, de acordo com a Reivindicação 147, **caracterizado**

por que o replicon de RNA de alphavirus modificado compreende pelo menos dois, três, quatro, cinco ou seis cassetes de expressão.

149. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 147 a 148, **caracterizado** por que pelo menos um de um ou mais cassetes de expressão é ligado de forma operacional a jusante de uma sequência de ácido nucleico codificando uma ou mais proteínas não estruturais nsp1-4 ou uma parte das mesmas do replicon de RNA de alphavirus modificado.

150. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 147 a 149, **caracterizado** por que pelo menos um de um ou mais cassetes de expressão ainda compreende uma terceira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais elementos estruturais de um potenciador de capsídeo viral, em que a terceira sequência de ácido nucleico é ligada de forma operacional a montante da sequência de codificação para o GOI.

151. Método, de acordo com a Reivindicação 150, **caracterizado** por que o replicon de RNA de alphavirus modificado ainda compreendendo uma sequência de codificação para um peptídeo autoprotease ligado de forma operacional a jusante à terceira sequência de ácido nucleico e a montante à sequência de codificação para o GOI.

152. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 147 a 151, **caracterizado** por que a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo selecionado do grupo consistindo em um polipeptídeo terapêutico, um polipeptídeo profilático, um polipeptídeo de diagnóstico, um polipeptídeo nutracêutico, uma enzima industrial, um polipeptídeo repórter e qualquer combinação dos mesmos.

153. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 147 a 151, **caracterizado** por que a sequência de codificação para o GOI codifica um polipeptídeo selecionado do grupo consistindo em um anticorpo, um antígeno, um modulador imunológico, uma citocina, uma enzima e qualquer combinação dos mesmos.

154. Método Para Conferir Resistência ao Sistema Imunológico

Inato em Indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando um replicon de RNA de não-alphavirus modificado, **caracterizado** por que o replicon de RNA de não-alphavirus modificado compreende uma primeira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais elementos estruturais de um potenciador de capsídeo de alphavirus e em que a expressão do replicon de RNA de não-alphavirus modificado codificado pela molécula de ácido nucleico confere uma resistência à resposta imunológica inata no indivíduo.

155. Método Para a Produção de Polipeptídeo de Interesse em Indivíduo, compreendendo a administração ao indivíduo de uma molécula de ácido nucleico compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando um replicon de RNA de não-alphavirus modificado, **caracterizado** por que o replicon de RNA de não-alphavirus modificado compreende uma primeira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais elementos estruturais de um potenciador de capsídeo de alphavirus.

156. Método Para Produzir Polipeptídeo de Interesse, compreendendo o cultivo de uma célula hospedeira compreendendo uma molécula de ácido nucleico, que compreende uma sequência de ácido nucleico codificando um replicon de RNA de não-alphavirus modificado, **caracterizado** por que o replicon de RNA de não-alphavirus modificado compreende uma primeira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais elementos estruturais de um potenciador de capsídeo de alphavirus.

157. Método, de acordo com a Reivindicação 154 ou 155, **caracterizado** por que o indivíduo é selecionado do grupo consistindo em humano, cavalo, porco, primata, camundongo, furão, rato, rato-do-algodão, gado, suíno, ovelha, coelho, gato, cachorro, pássaro, peixe, cabra, jumento, hamster e búfalo.

158. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 154 a 157, **caracterizado** por que o replicon de RNA de não-alphavirus

modificado ainda compreendendo uma segunda sequência de ácido nucleico codificando pelo menos uma proteína viral não estrutural ou uma parte da mesma, em que a primeira sequência de ácido nucleico é ligada de forma operacional a montante à segunda sequência de ácido nucleico.

159. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 154 a 158, **caracterizado** por que o replicon de RNA de não-alphavirus modificado ainda compreende uma sequência de codificação para um peptídeo autoprotease ligado de forma operacional a jusante à primeira sequência de ácido nucleico e a montante à segunda sequência de ácido nucleico.

160. Método, de acordo com a Reivindicação 159, **caracterizado** por que o peptídeo autoprotease compreende uma sequência de peptídeo selecionada do grupo consistindo em teschovírus suíno-1 2A (P2A), um vírus da febre aftosa (FMDV) 2A (F2A), um vírus A da rinite equina (ERAV) 2A (E2A), um Thosa asigna virus 2A (T2A), vírus da poliedrose citoplasmática 2A (BmCPV2A), um Flacherie Virus 2A (BmIFV2A) e uma combinação dos mesmos.

161. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 154 a 160, **caracterizado** por que o replicon de RNA de não-alphavirus modificado compreende um replicon de RNA modificado derivado de um vírus de RNA de filamento positivo.

162. Método, de acordo com a Reivindicação 161, **caracterizado** por que o vírus de RNA de filamento positivo é uma espécie de vírus pertencente a uma família selecionada do grupo consistindo na família *Togaviridae*, família *Flaviviridae*, família *Orthomyxoviridae*, família *Rhabdoviridae* e família *Paramyxoviridae*.

163. Método, de acordo com a Reivindicação 161, **caracterizado** por que o vírus de RNA de filamento positivo é uma espécie de vírus pertence ao gênero *Arterivirus* da família *Arteriviridae*.

164. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 154 a 163, **caracterizado** por que a sequência codificando o replicon de

RNA modificado de não-alphavirus compreende ainda um ou mais cassetes de expressão, em que cada um dos cassetes de expressão compreende um promotor ligado de forma operacional a uma sequência de codificação para um gene de interesse (GOI).

165. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 154 a 164, **caracterizado** por que o replicon de RNA de não-alphavirus modificado compreende pelo menos dois, três, quatro, cinco, ou seis cassetes de expressão.

166. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 154 a 165, **caracterizado** por que pelo menos um de um ou mais cassetes de expressão é ligado de forma operacional a jusante da segunda sequência de ácido nucleico codificando a pelo menos uma proteína viral não estrutural ou uma parte da mesma do replicon de RNA de não-alphavirus modificado.

167. Método, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 154 a 166, **caracterizado** por que pelo menos um de um ou mais cassetes de expressão ainda compreende uma terceira sequência de ácido nucleico codificando um ou mais elementos estruturais de um potenciador de capsídeo de alphavirus, em que a terceira sequência de ácido nucleico é ligada de forma operacional a montante à sequência de codificação para o GOI.

168. Método, de acordo com a Reivindicação 167, **caracterizado** por que o replicon de RNA de não-alphavirus modificado ainda compreende uma sequência de codificação para um peptídeo autoprotease ligado de forma operacional a jusante à terceira sequência de ácido nucleico e a montante à sequência de codificação para o GOI.

169. Polipeptídeo Recombinante, **caracterizado** por que é produzido através do método conforme definido em qualquer uma das Reivindicações de 121-153 e 155-168.

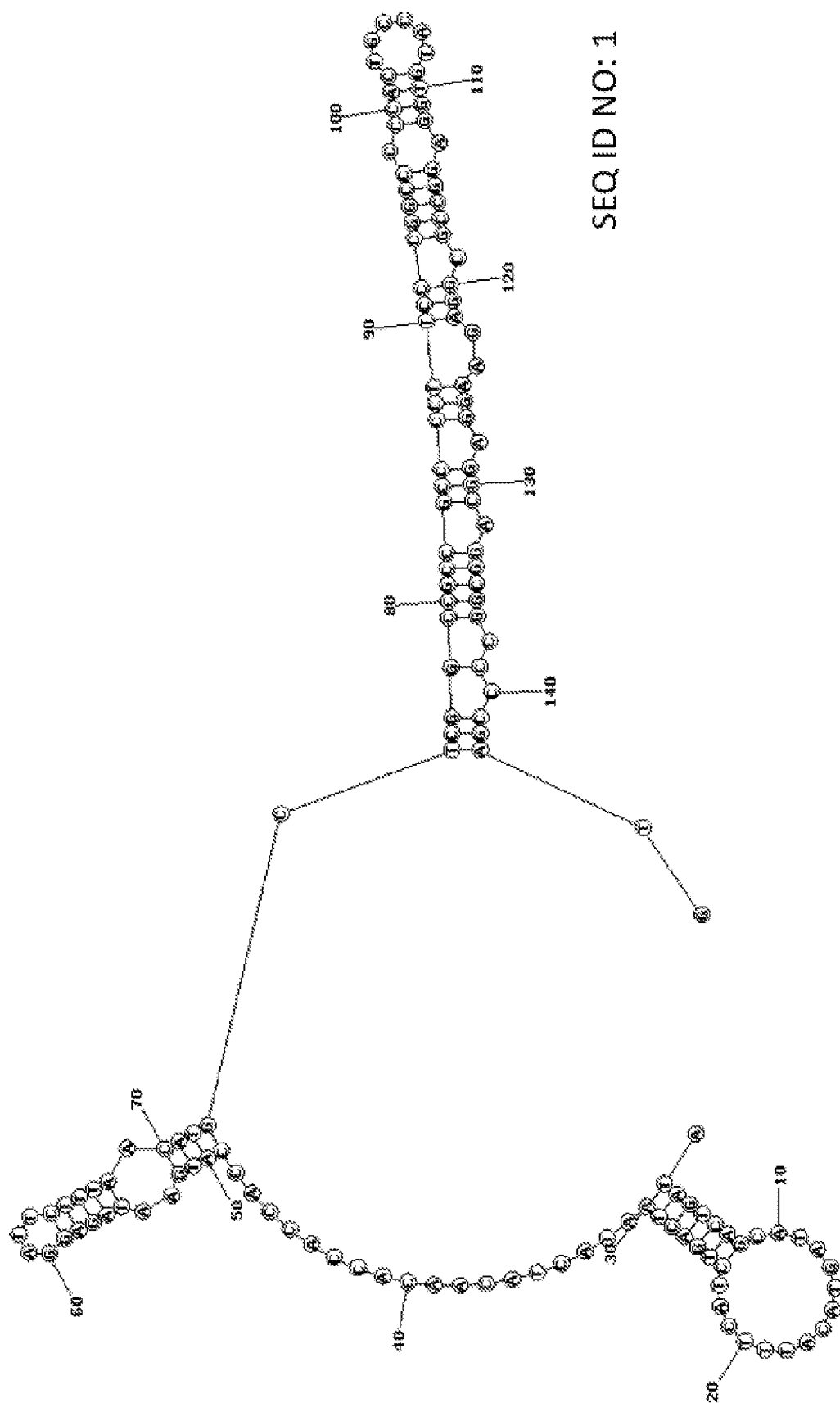
170. Composição, **caracterizada** por que compreende um polipeptídeo recombinante conforme definido na Reivindicação 169 e um portador farmacêuticamente aceitável.

171. Composição, caracterizada por que compreende uma molécula de ácido nucleico conforme definida em qualquer uma das Reivindicações de 1-27 e 69-113 e um portador farmacêuticamente aceitável.

172. Composição, caracterizada por que compreende uma célula recombinante conforme definida em qualquer uma das Reivindicações de 114 a 117 e um portador farmacêuticamente aceitável.

173. Composição, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 170 a 172, **caracterizada** por que a composição é formulada em uma formulação farmacêutica.

174. Composição, de acordo com qualquer uma das Reivindicações de 170 a 173, **caracterizada** por que a composição é formulada em uma formulação farmacêutica com compostos covalentes, compostos não covalentes, composições físicas, ou tampões farmacêuticamente aceitáveis.



SEQ ID NO: 1

FIG 1

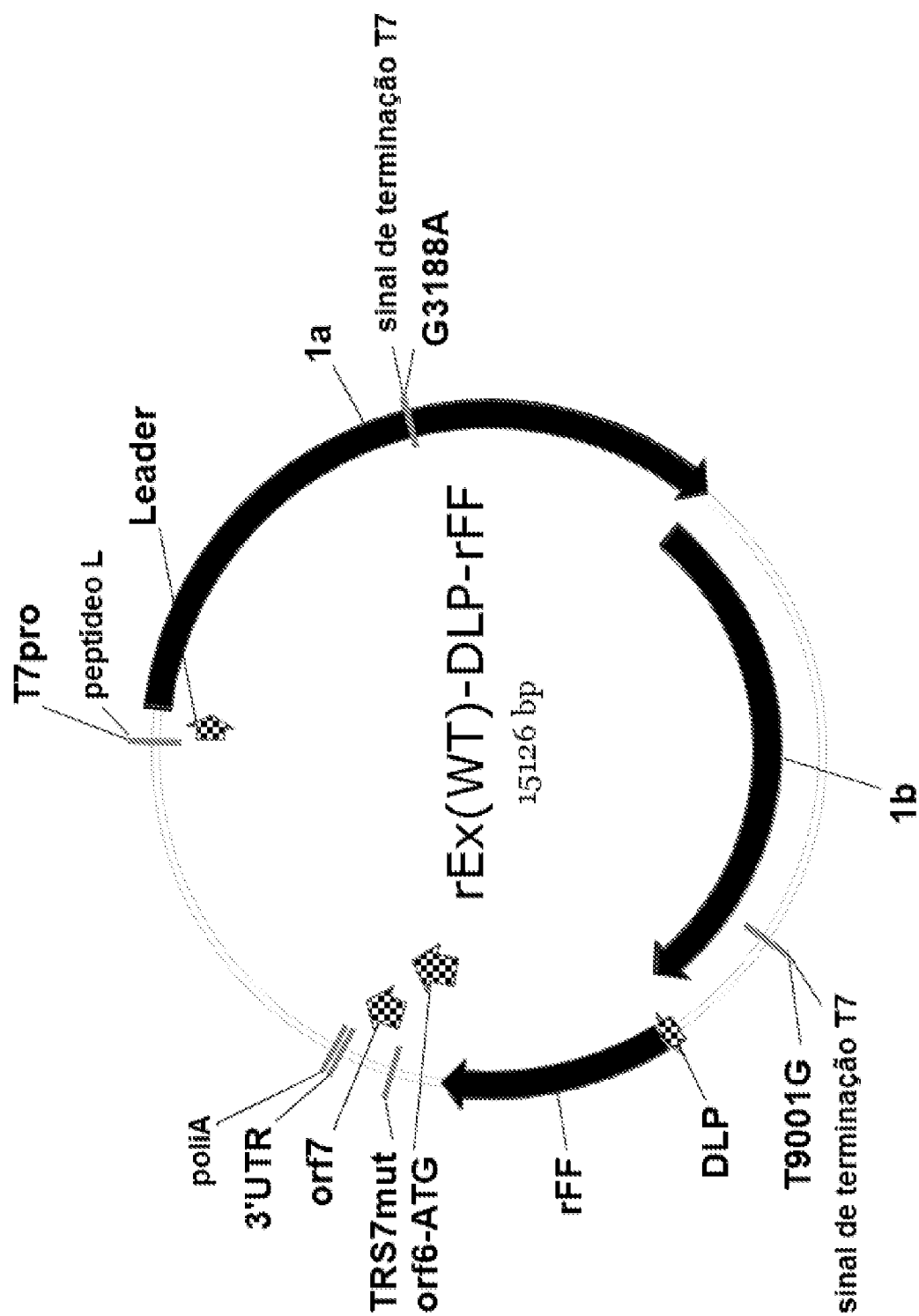


FIG. 2A

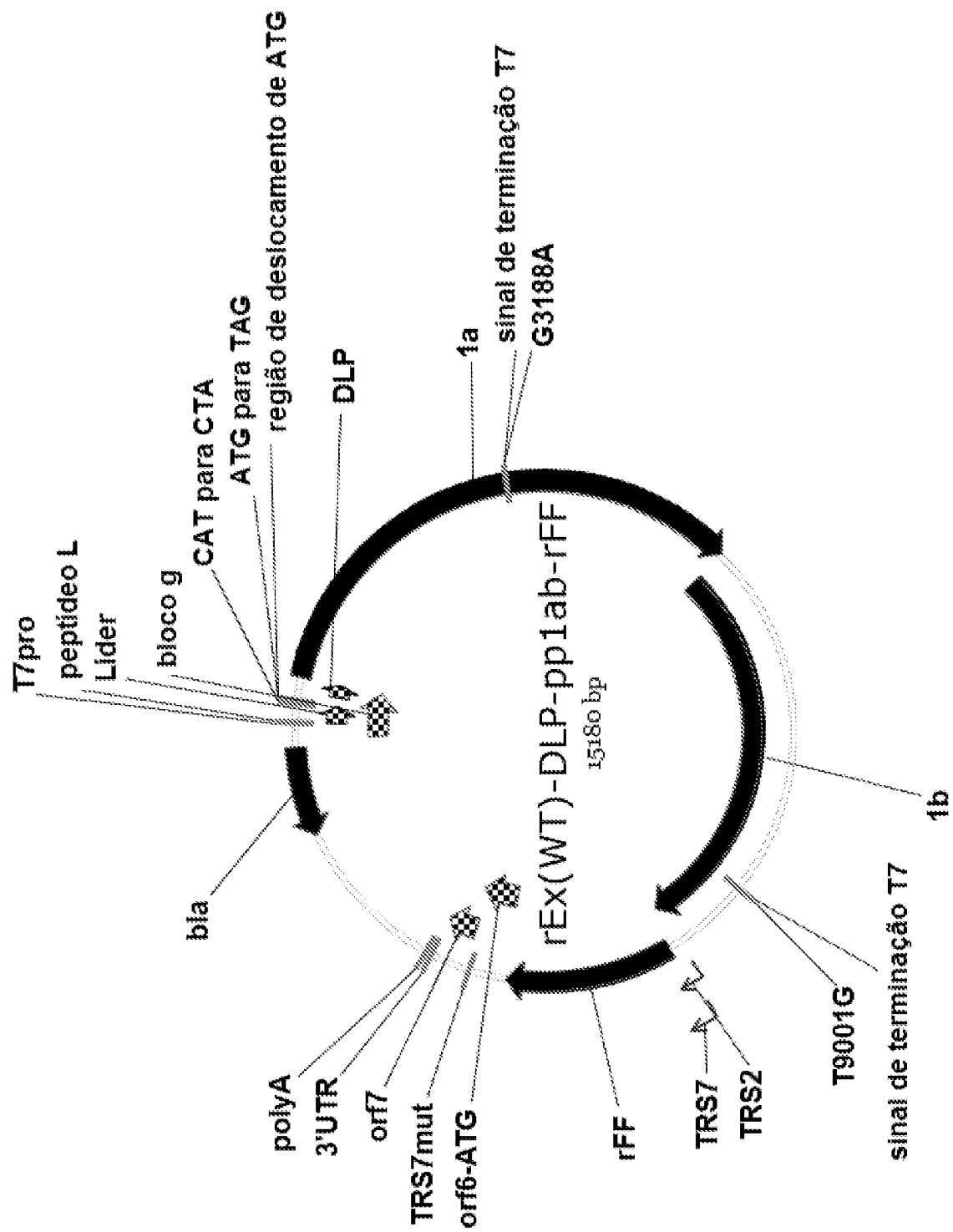


FIG. 2B

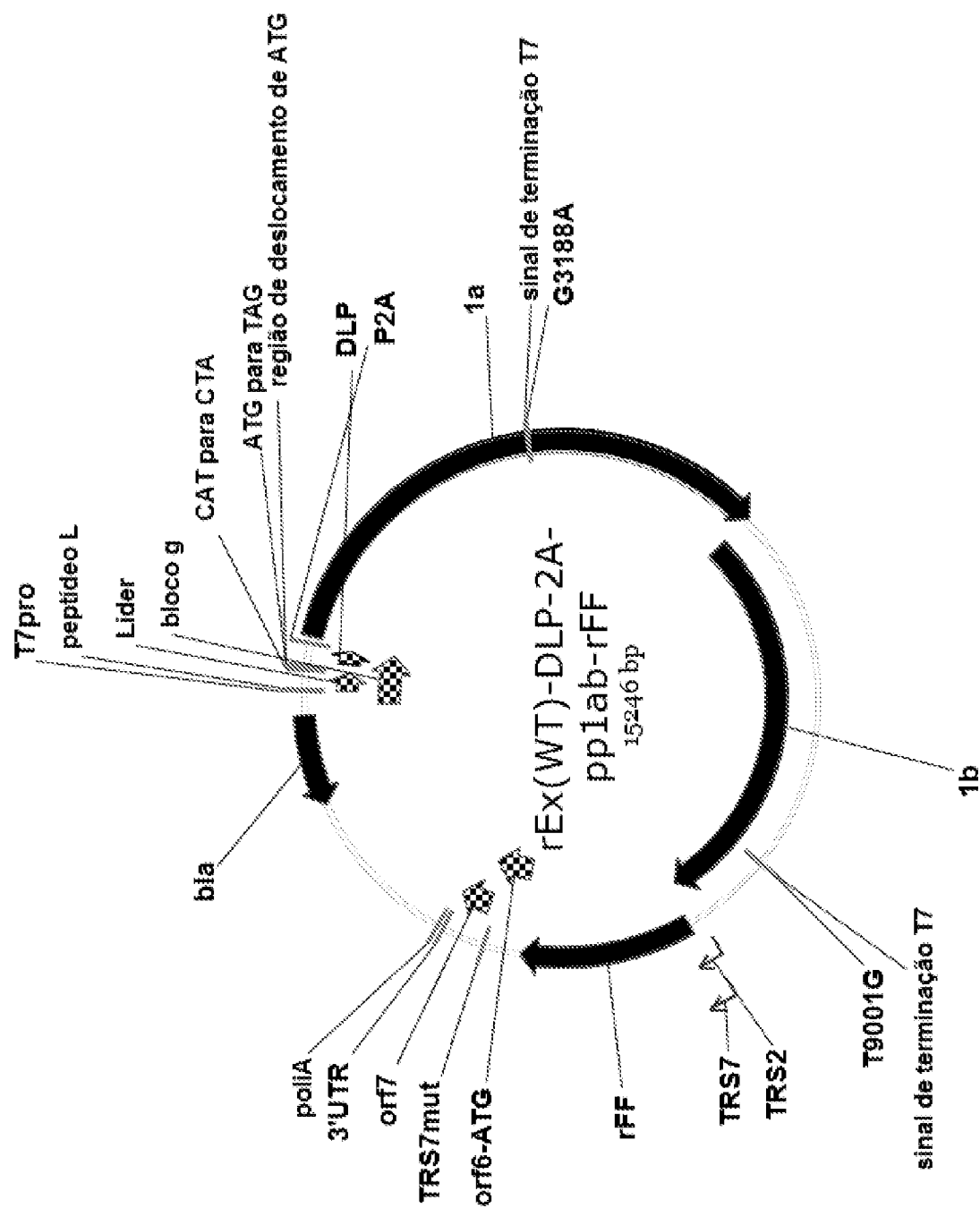


FIG. 2C

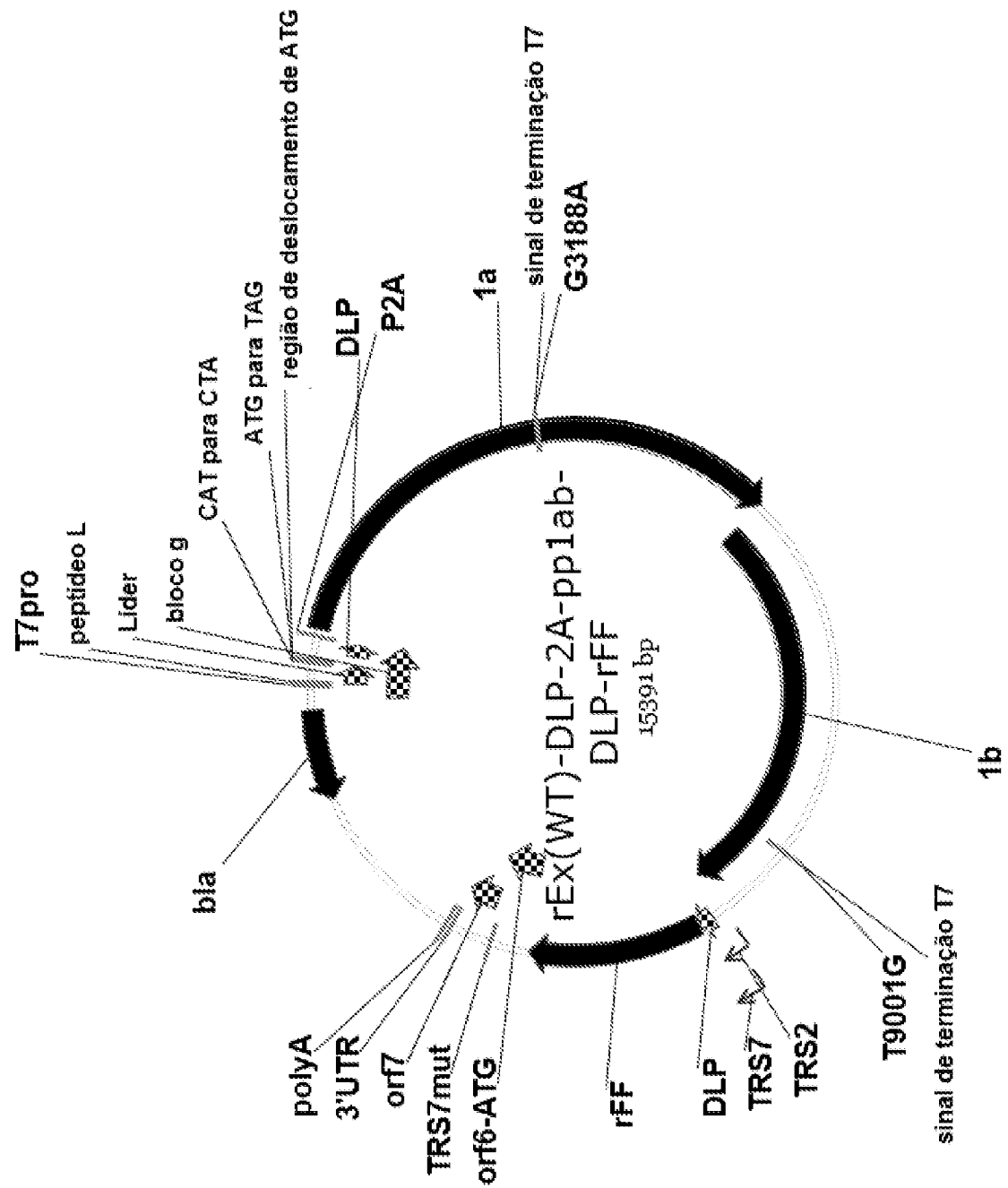


FIG. 2D

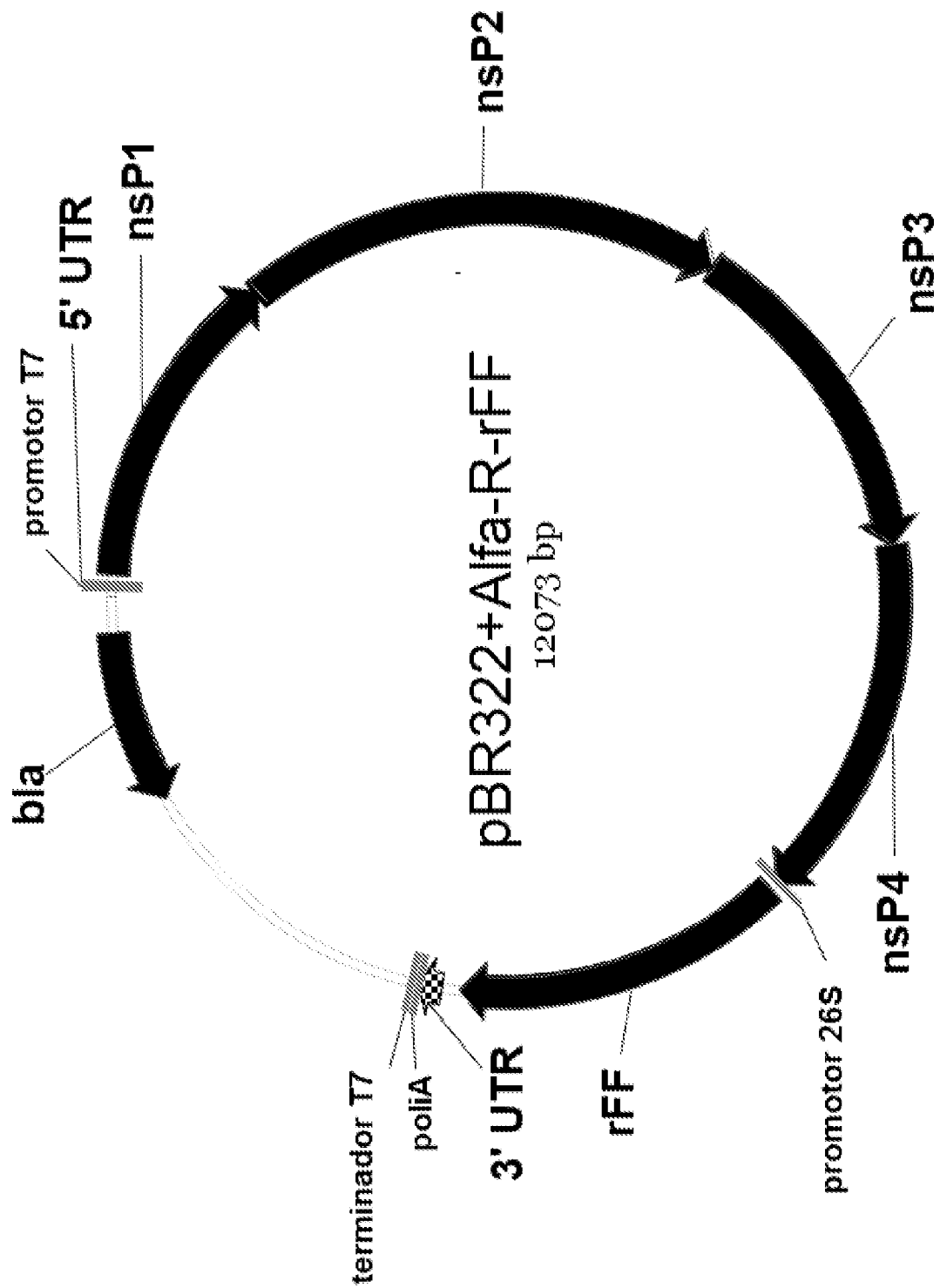


FIG. 3A

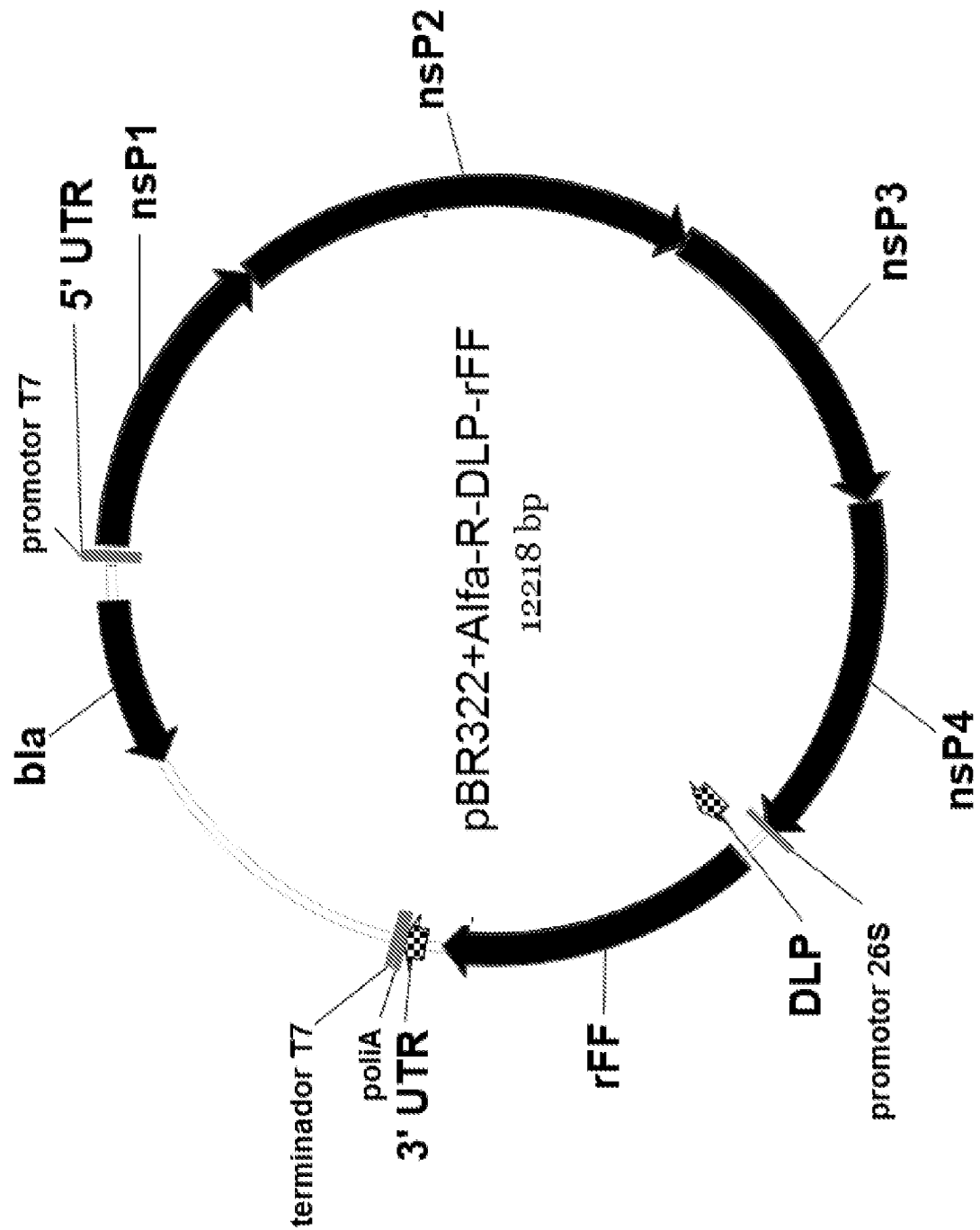


FIG. 3B

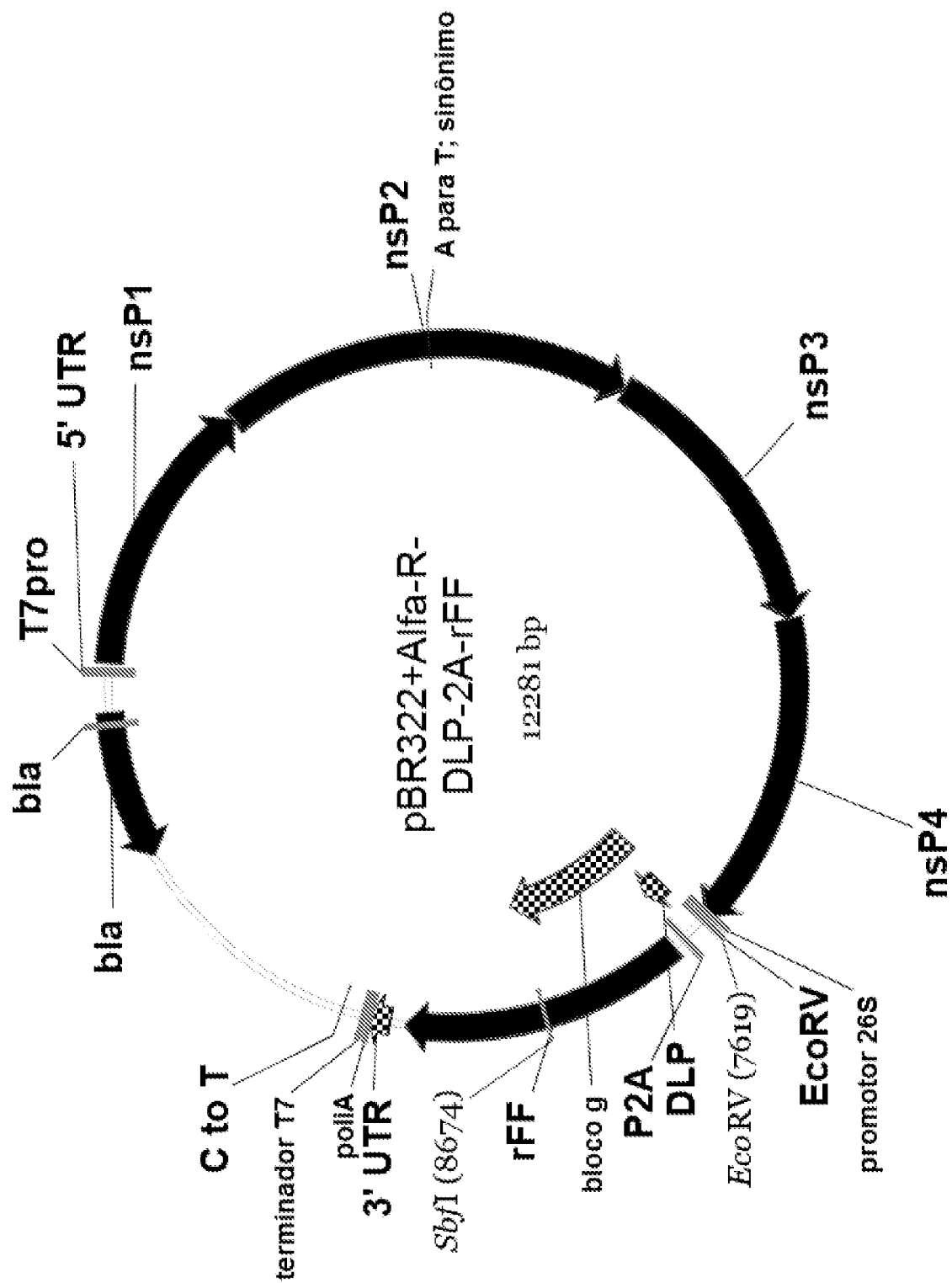


FIG. 3C

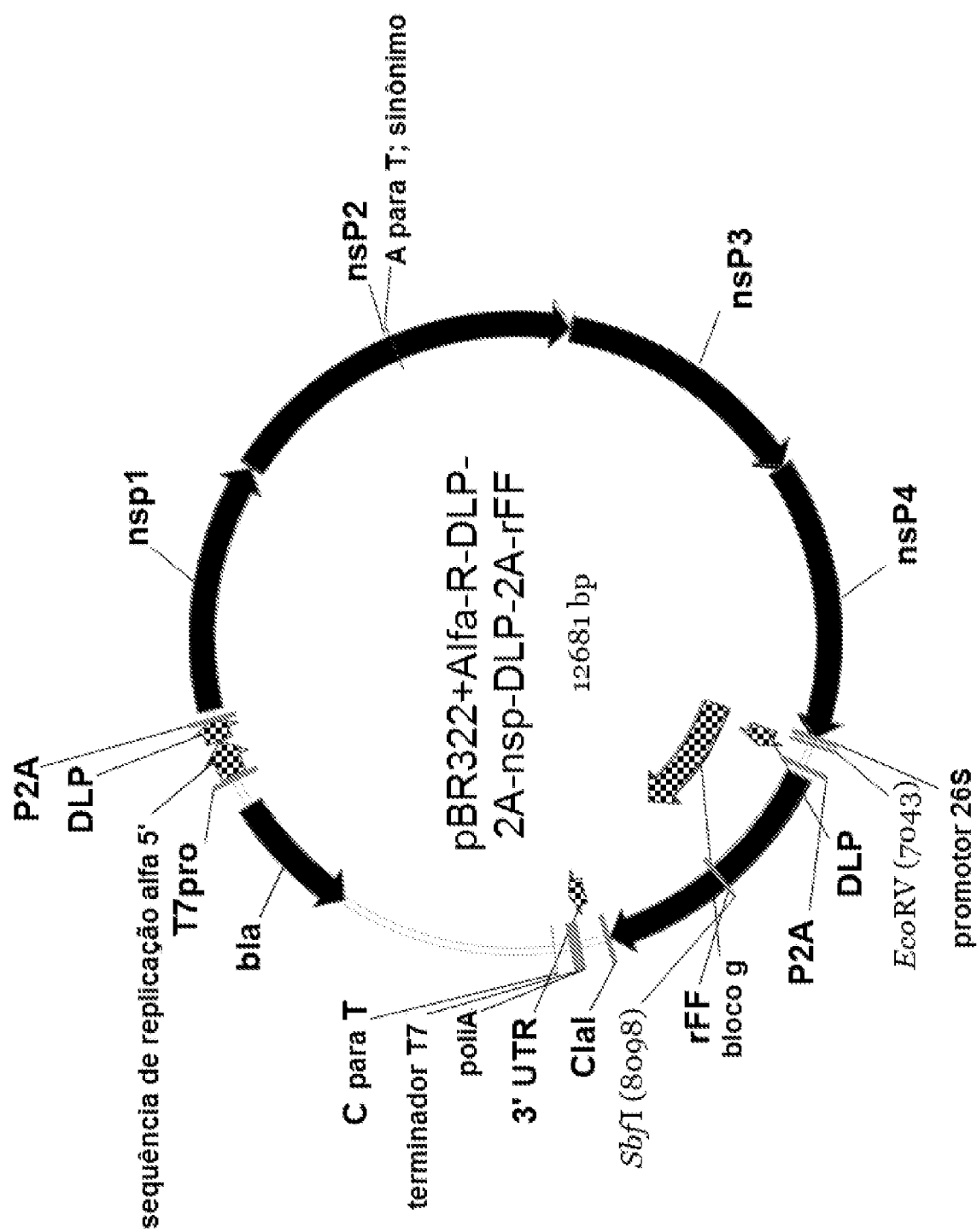


FIG. 3D

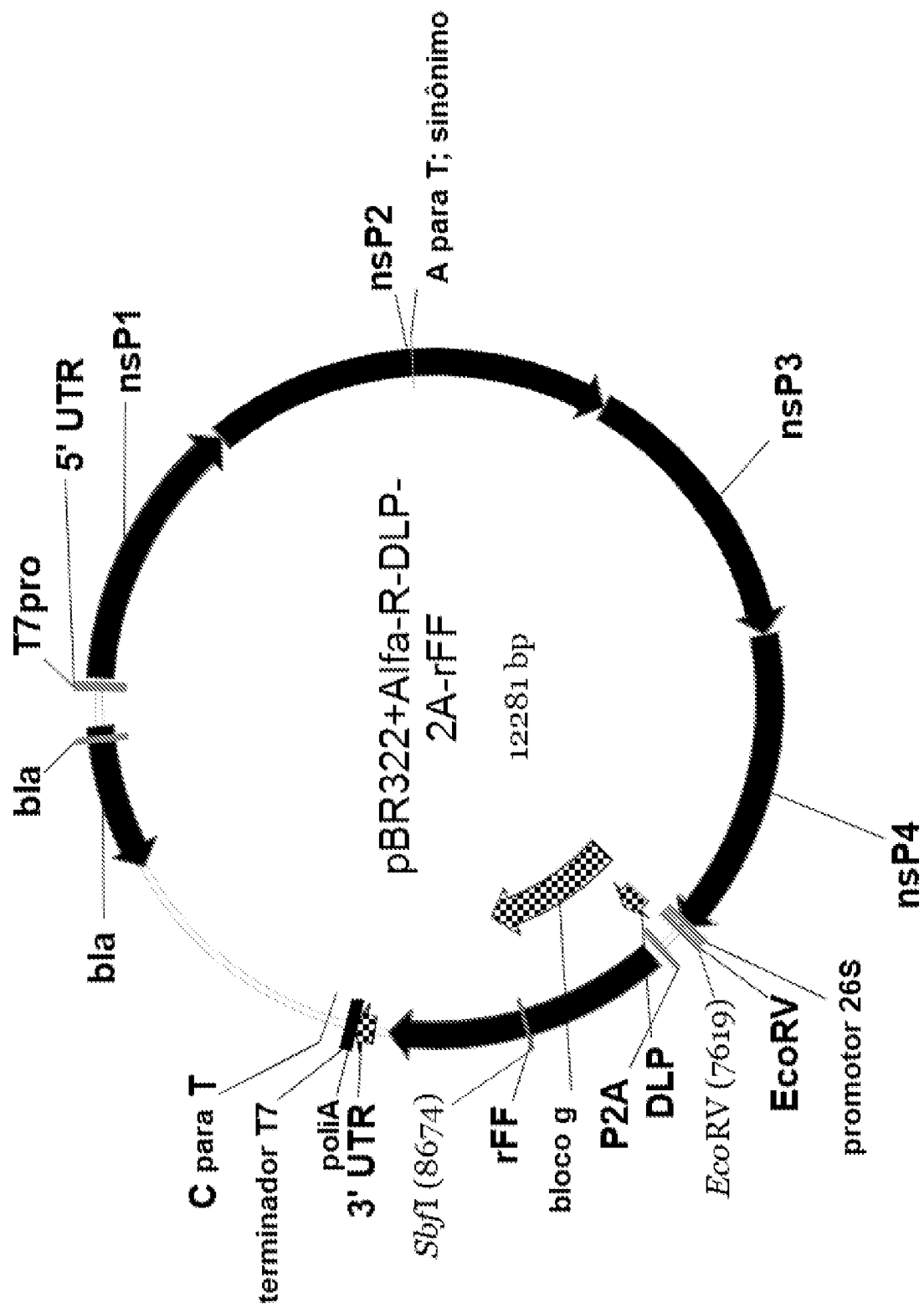


FIG. 4A

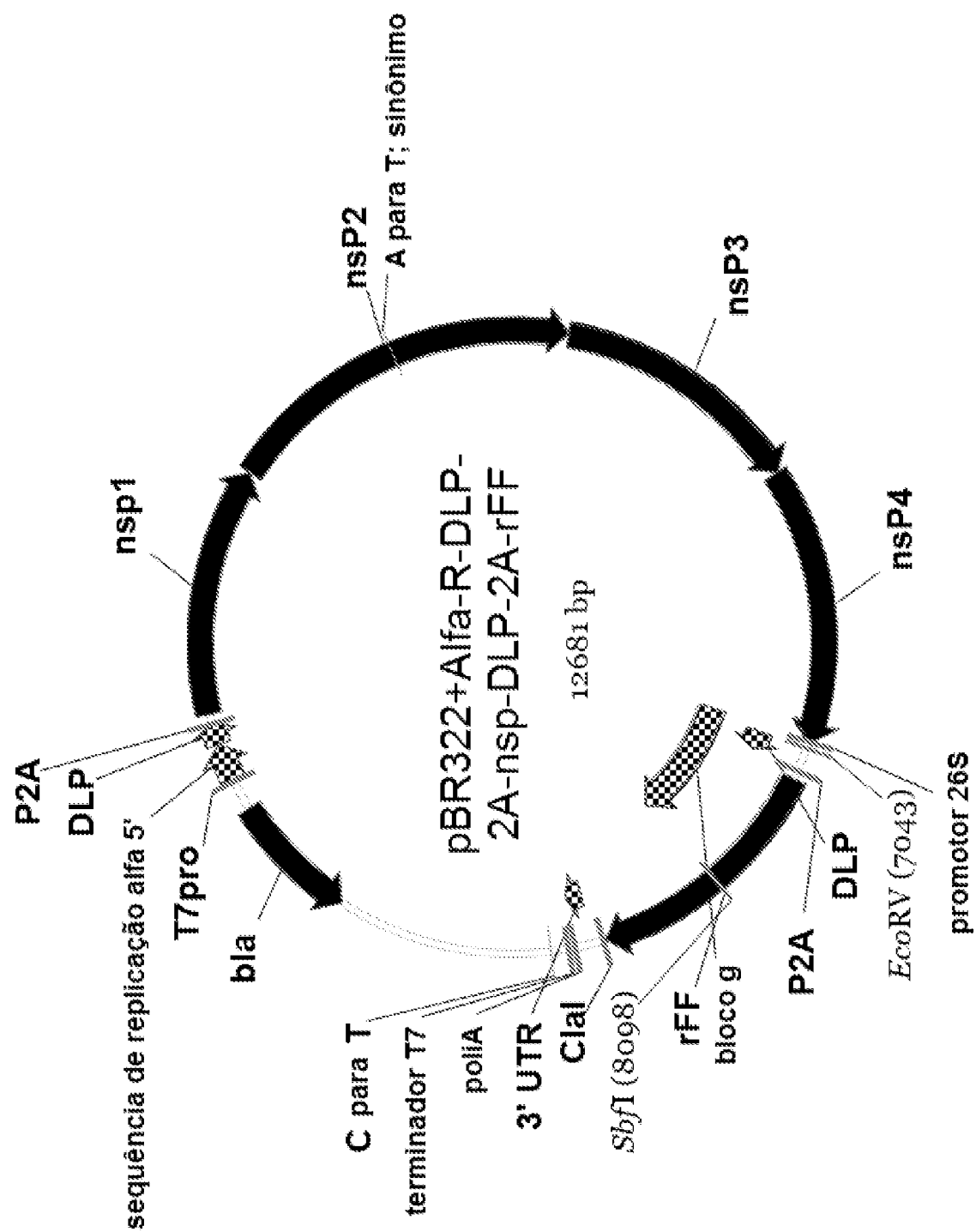
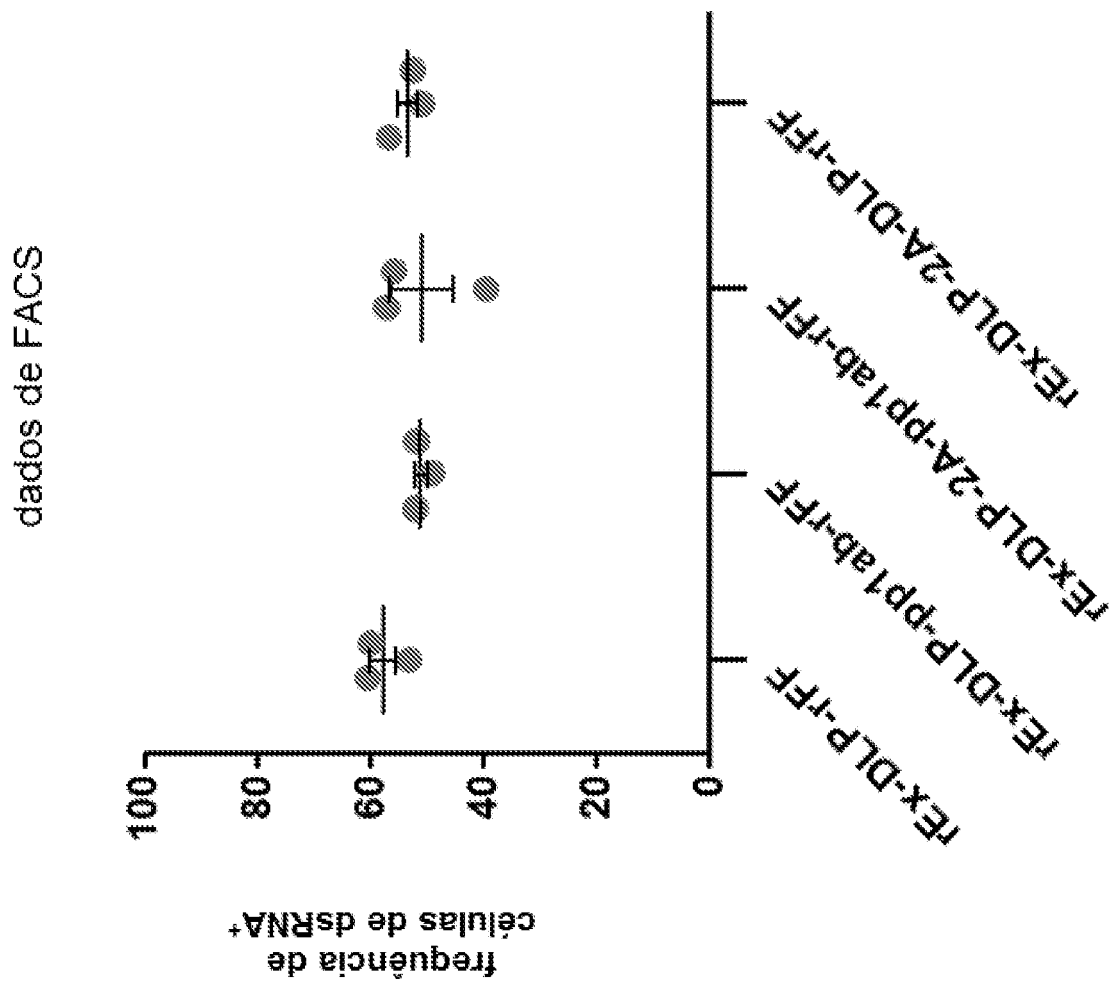
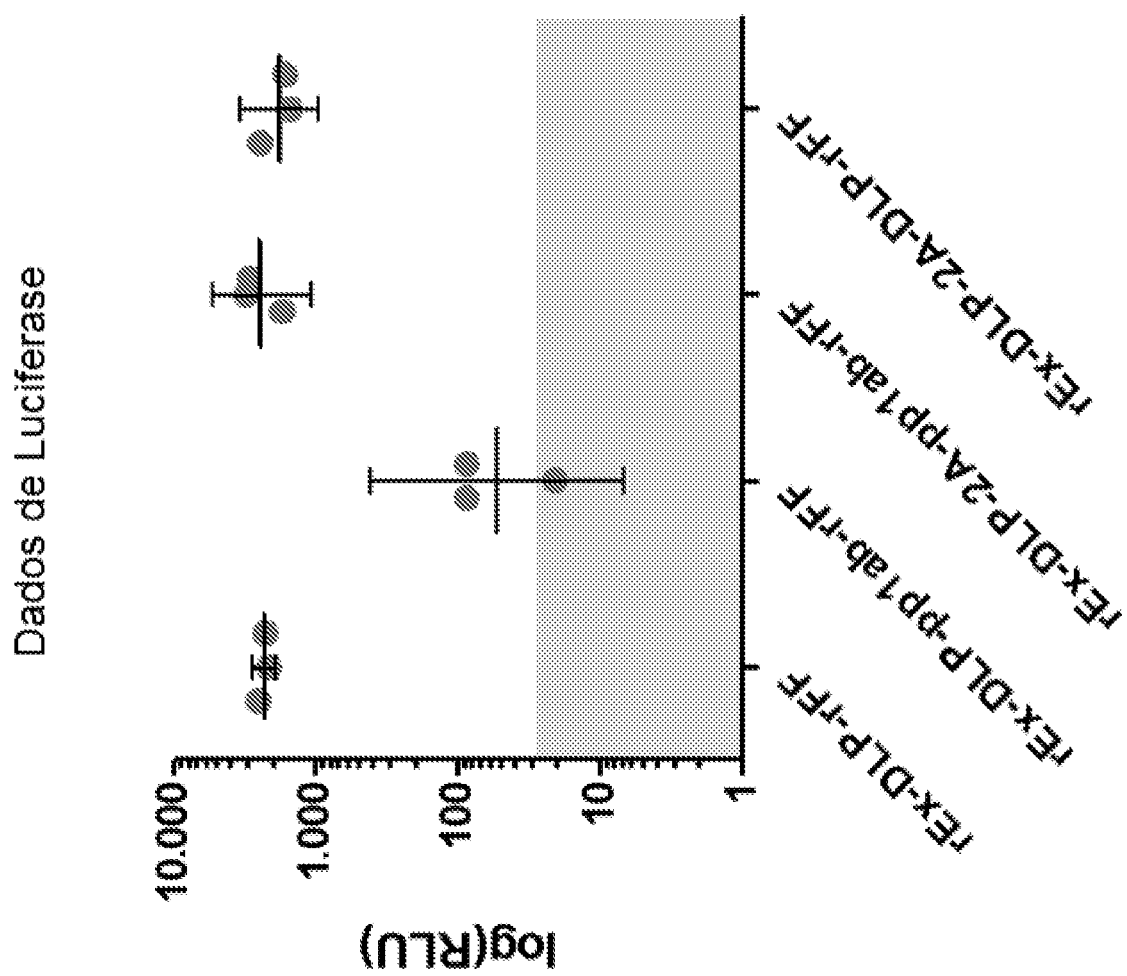


FIG. 4B

*FIG. 5A*

*FIG. 5B*

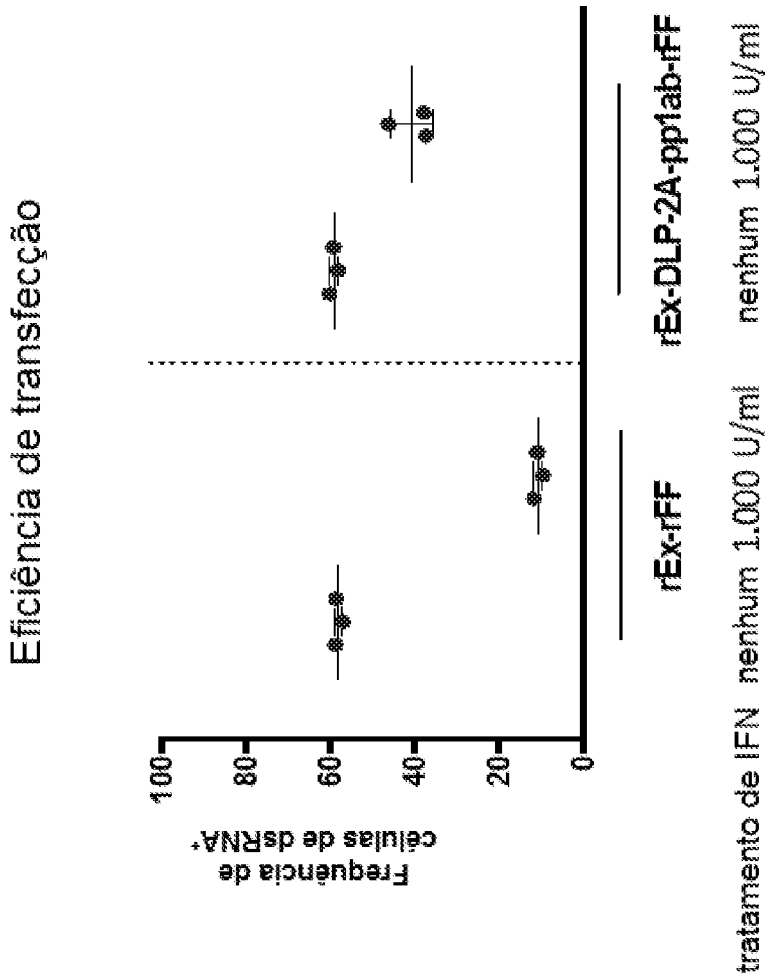


FIG. 6A

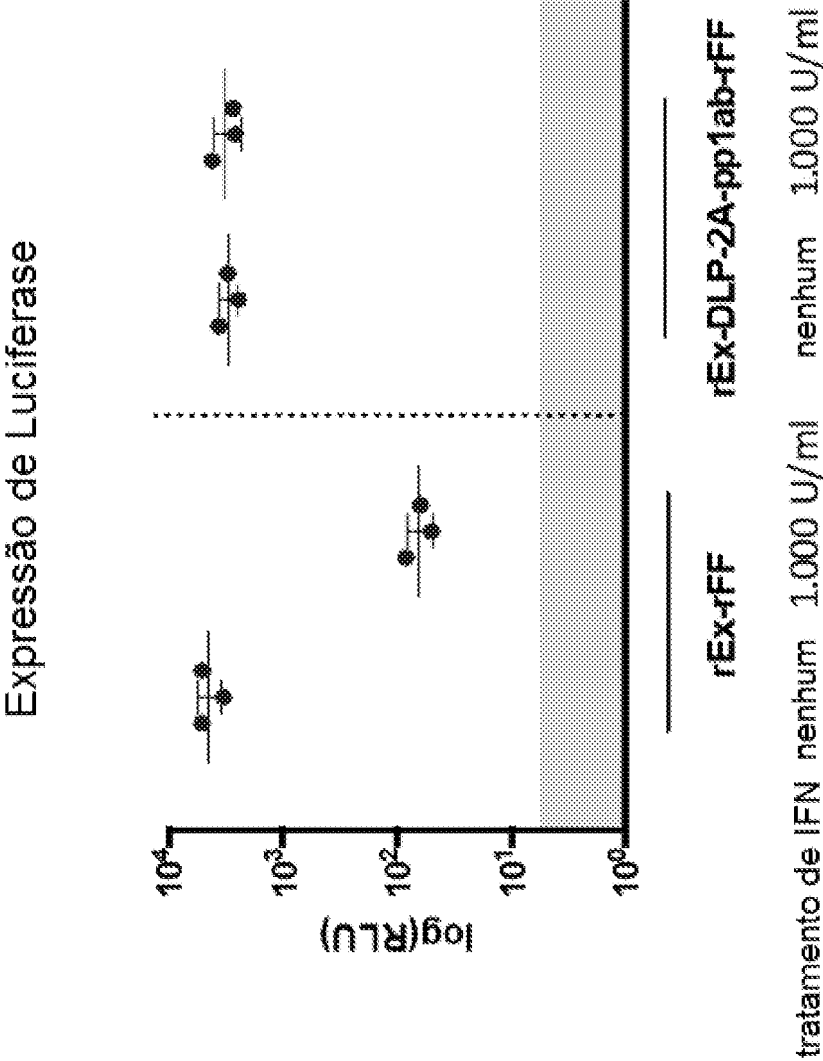


FIG. 6B

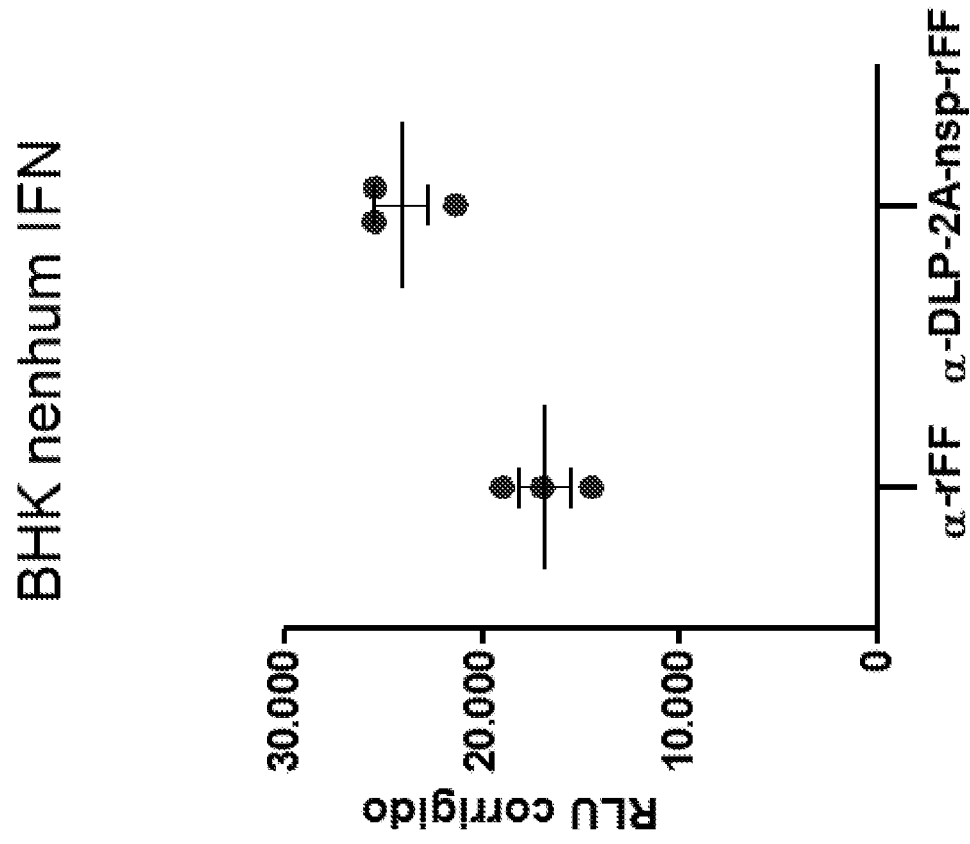


FIG. 7A

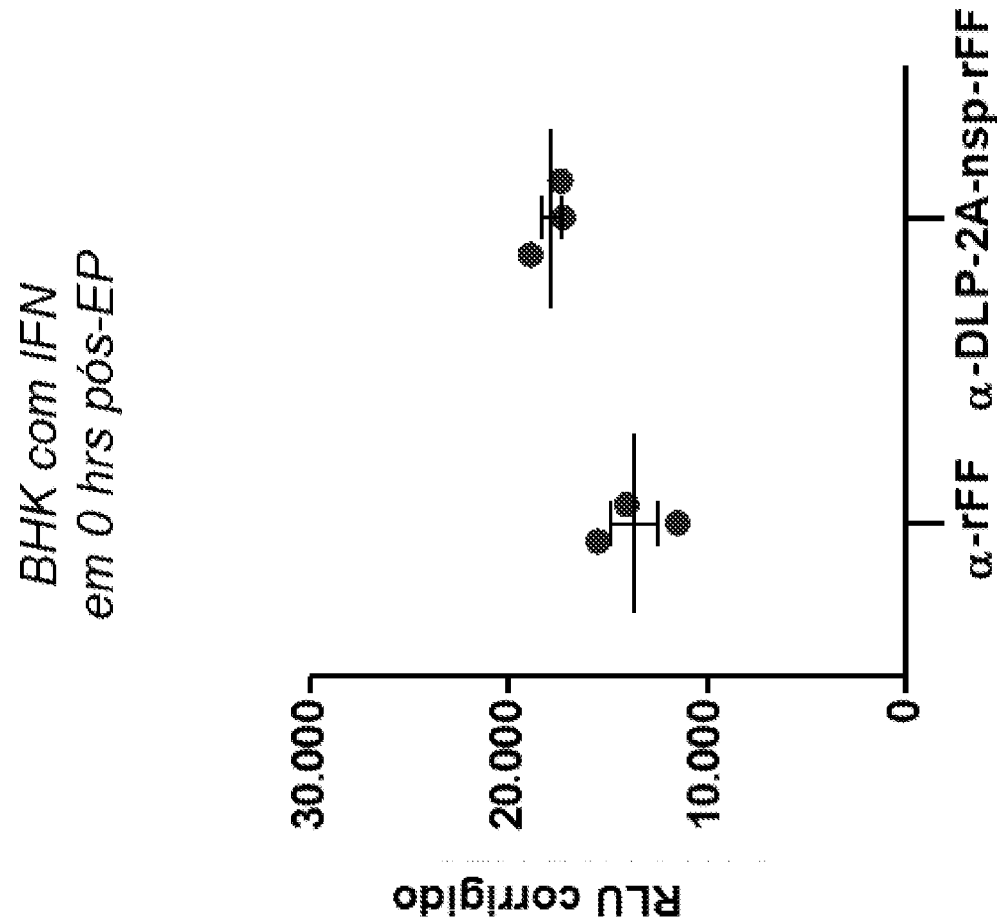


FIG. 7B

BHK com IFN
em 3 hrs pós-EP

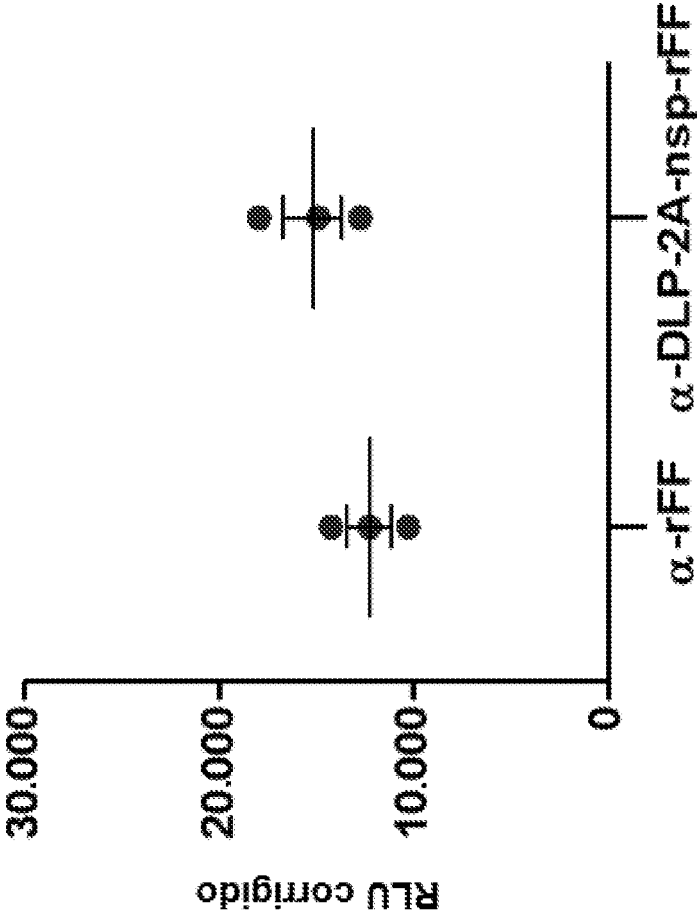


FIG. 7C

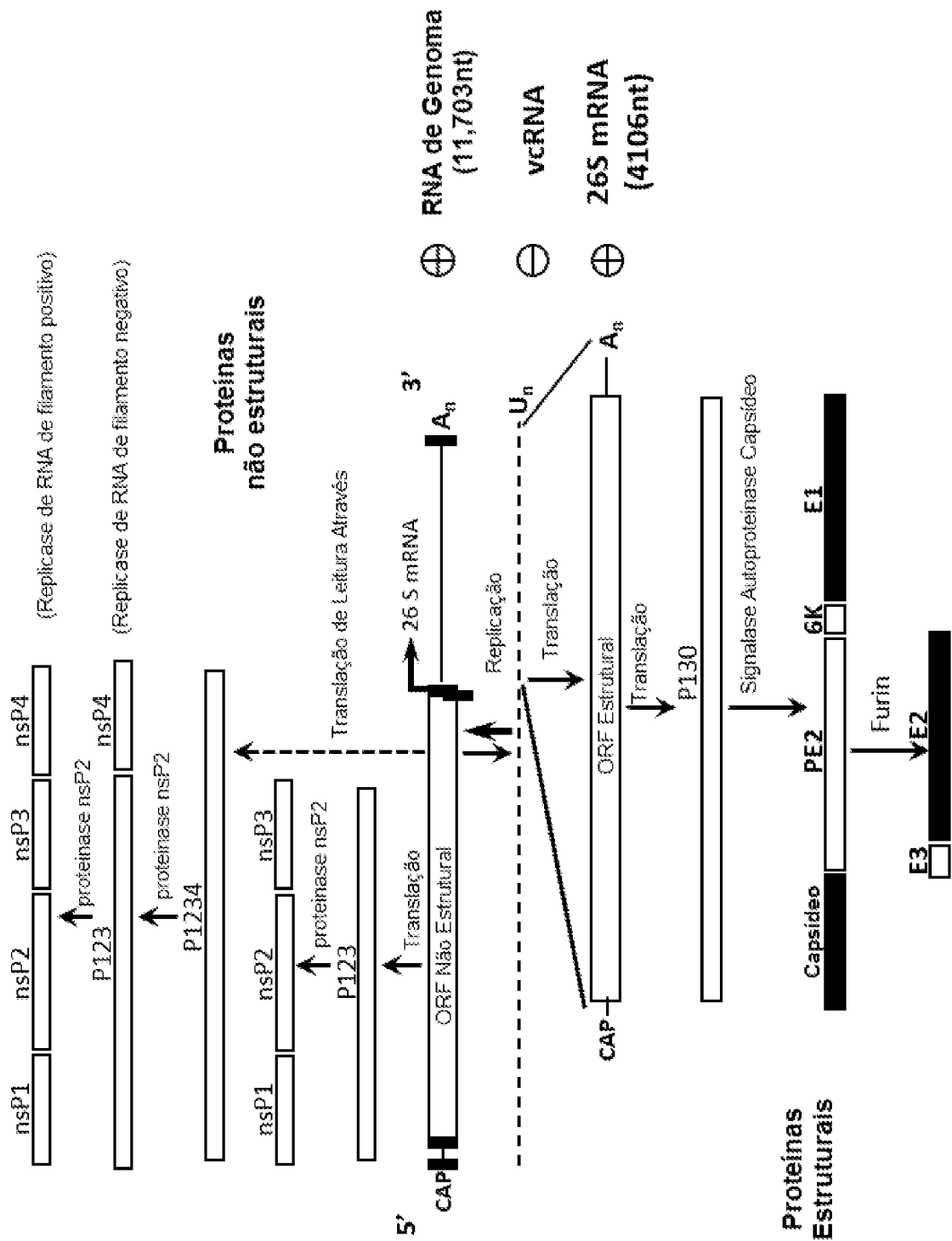


FIG. 9

Adaptado de Strauss et al., 1994

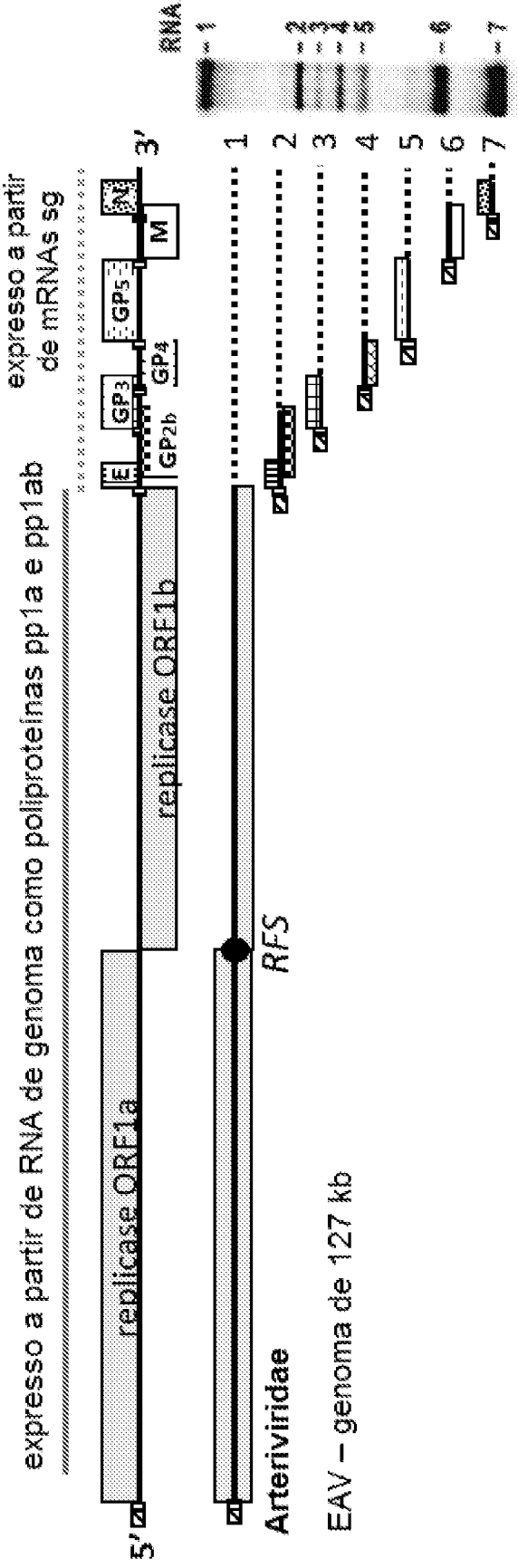


FIG. 10

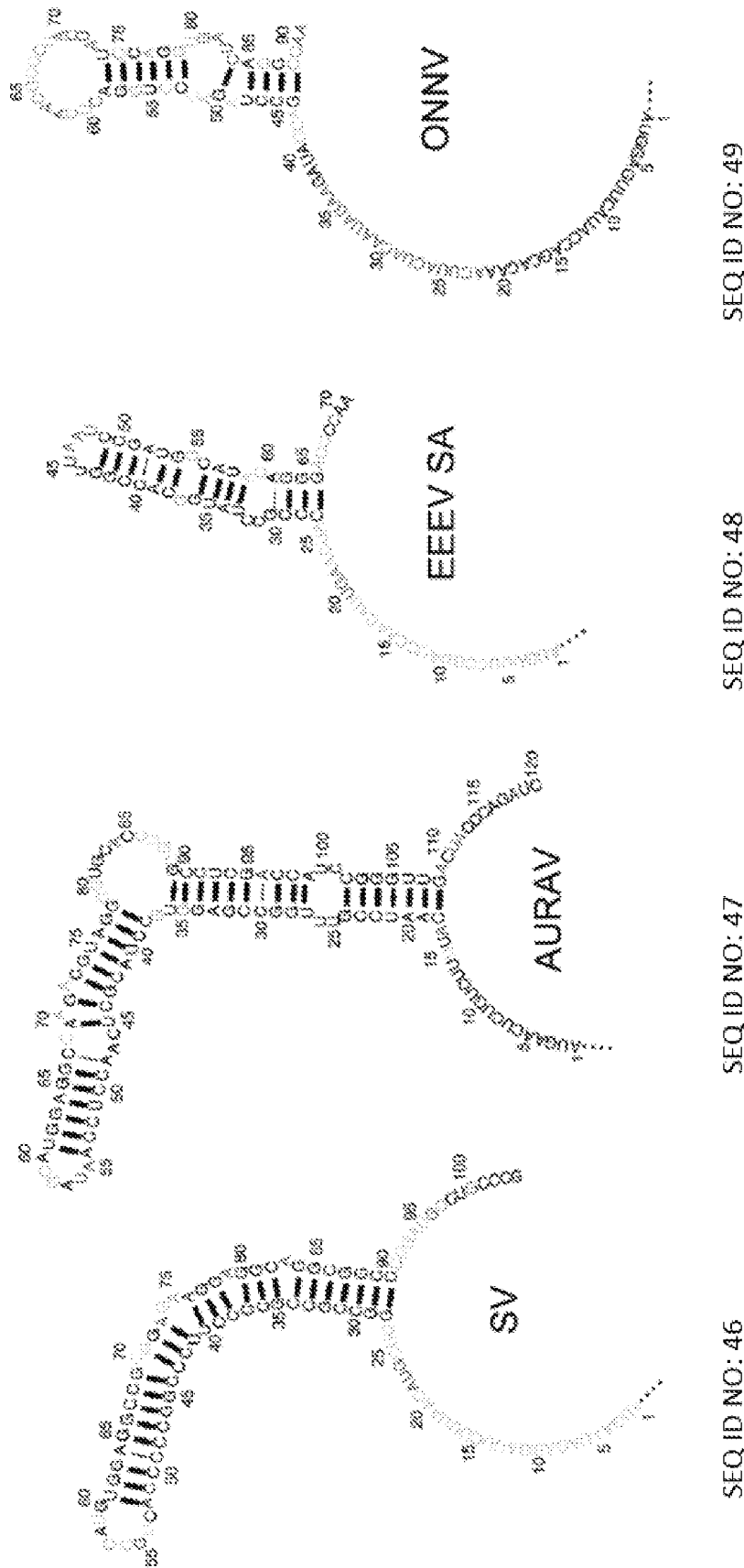


FIG. 11A

Adotado a partir de Toribio et al. 2016

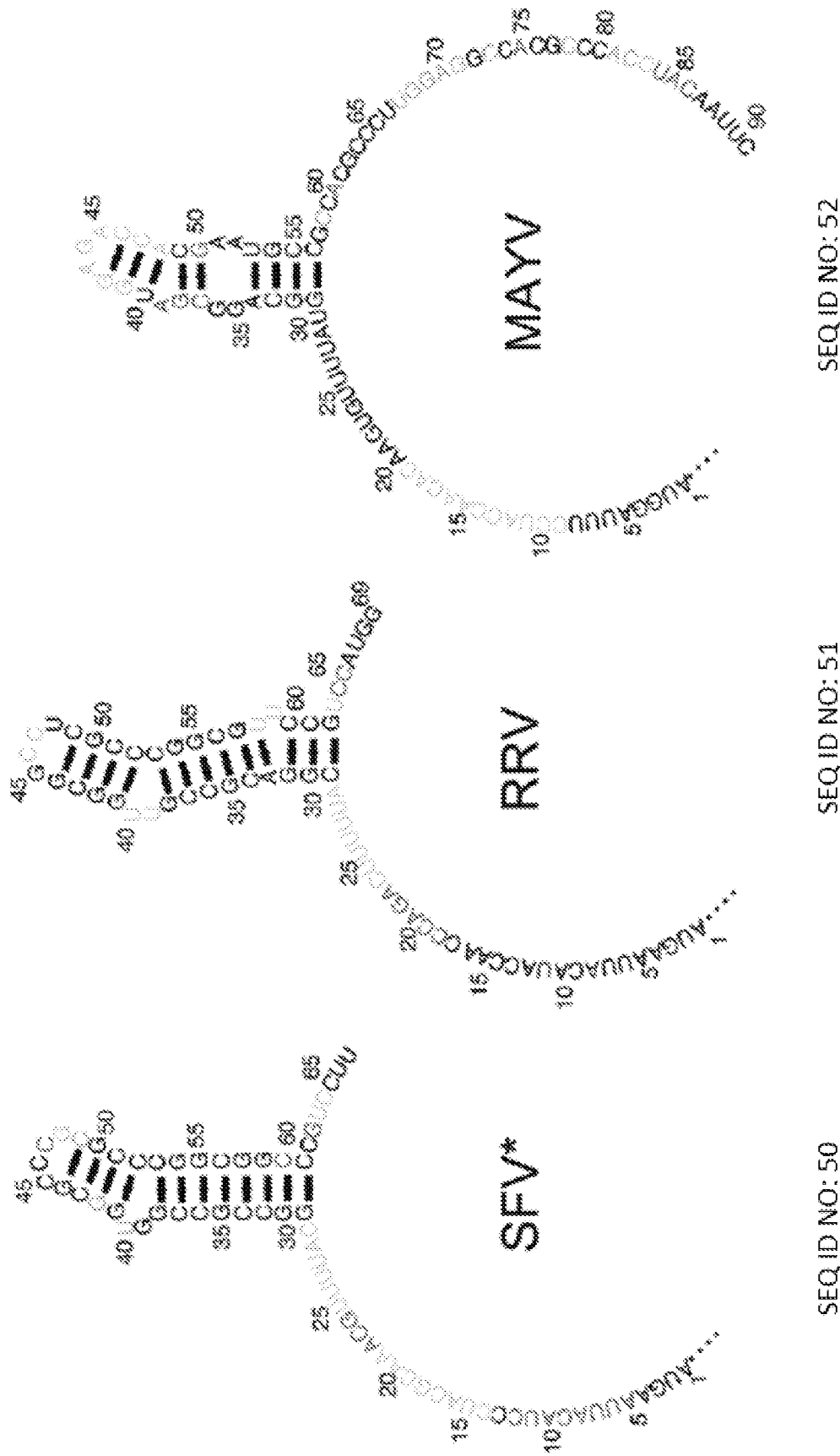


FIG. 11B

Adotado a partir de Toribio et al. 2016

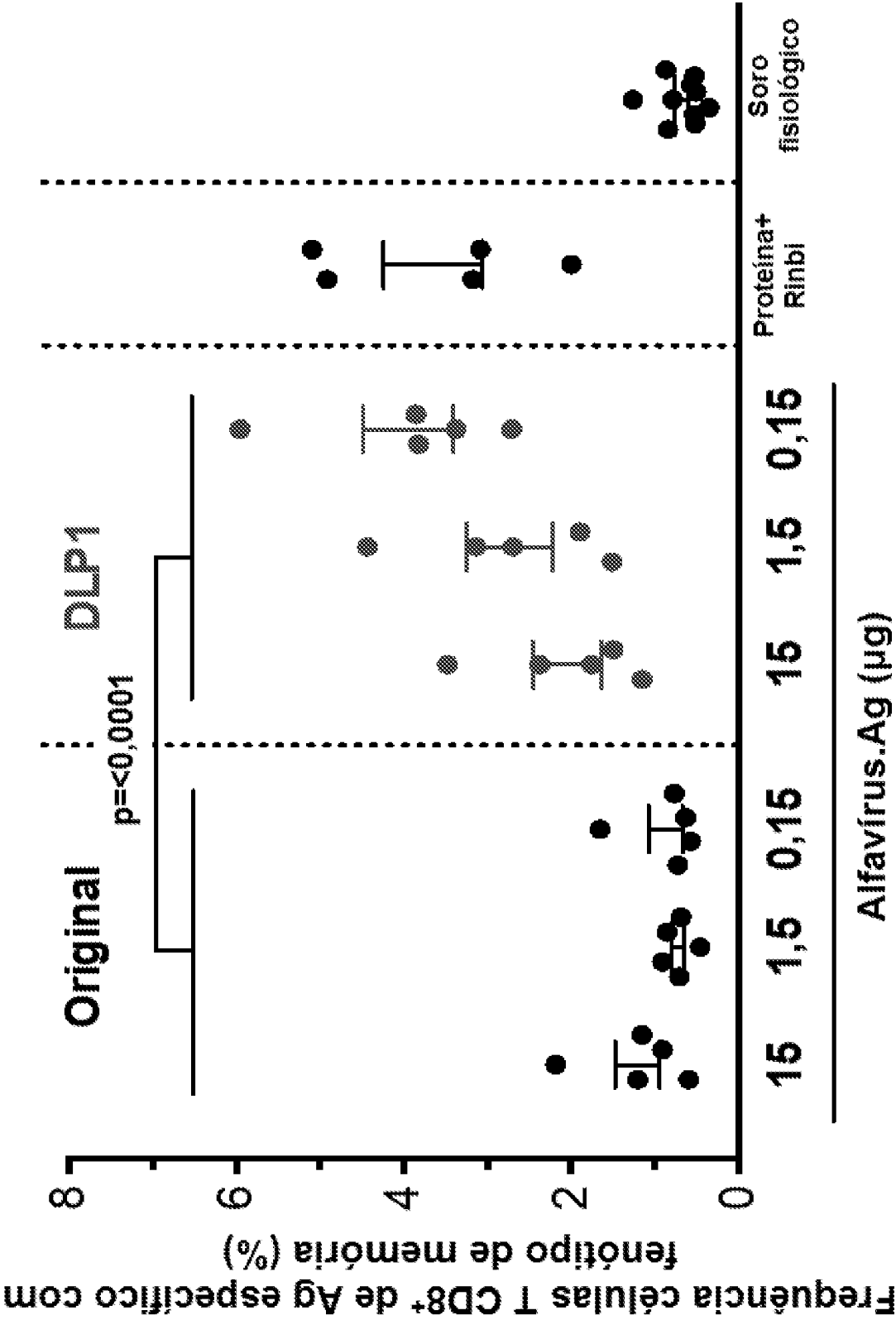


FIG. 12A

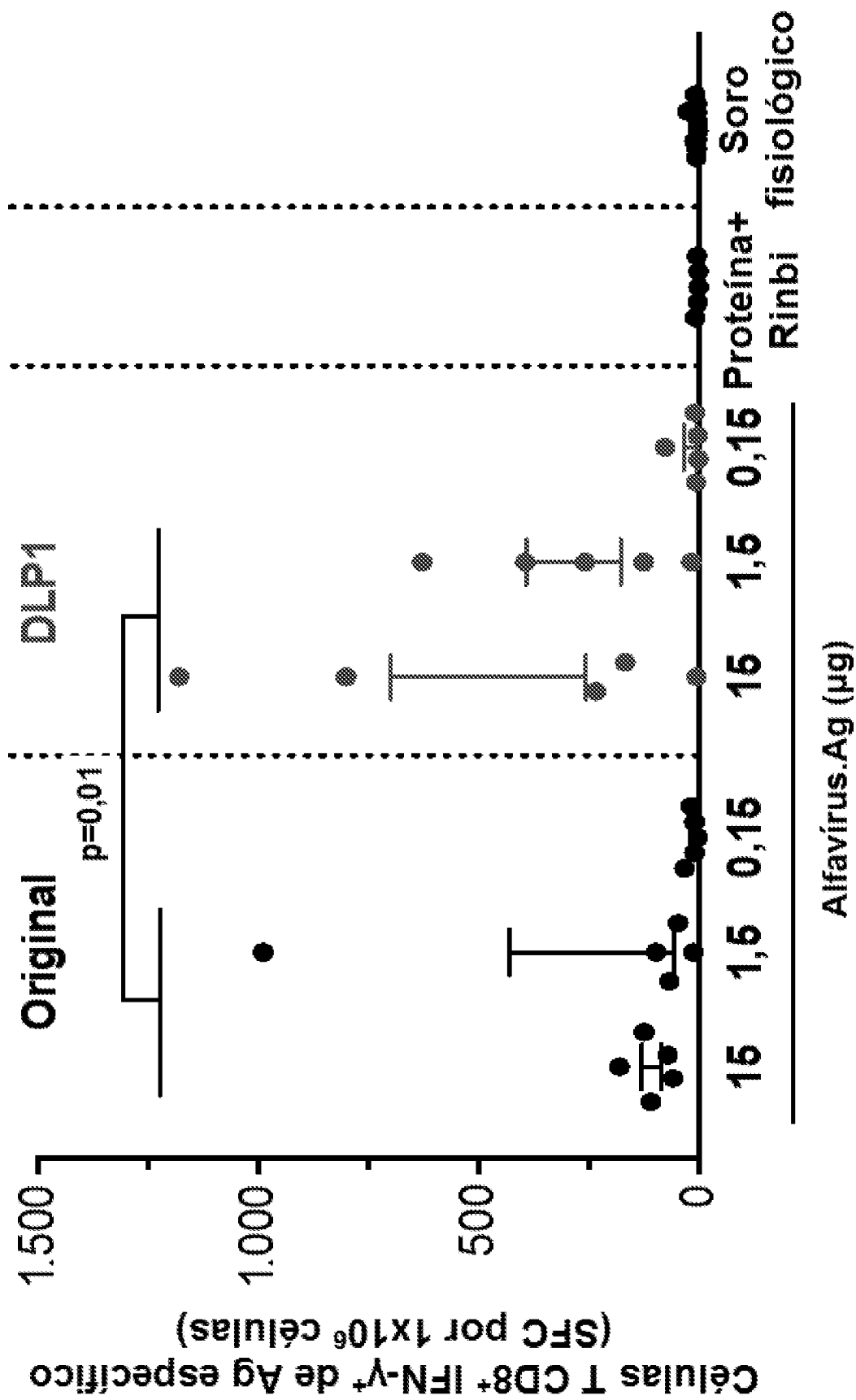


FIG. 12B

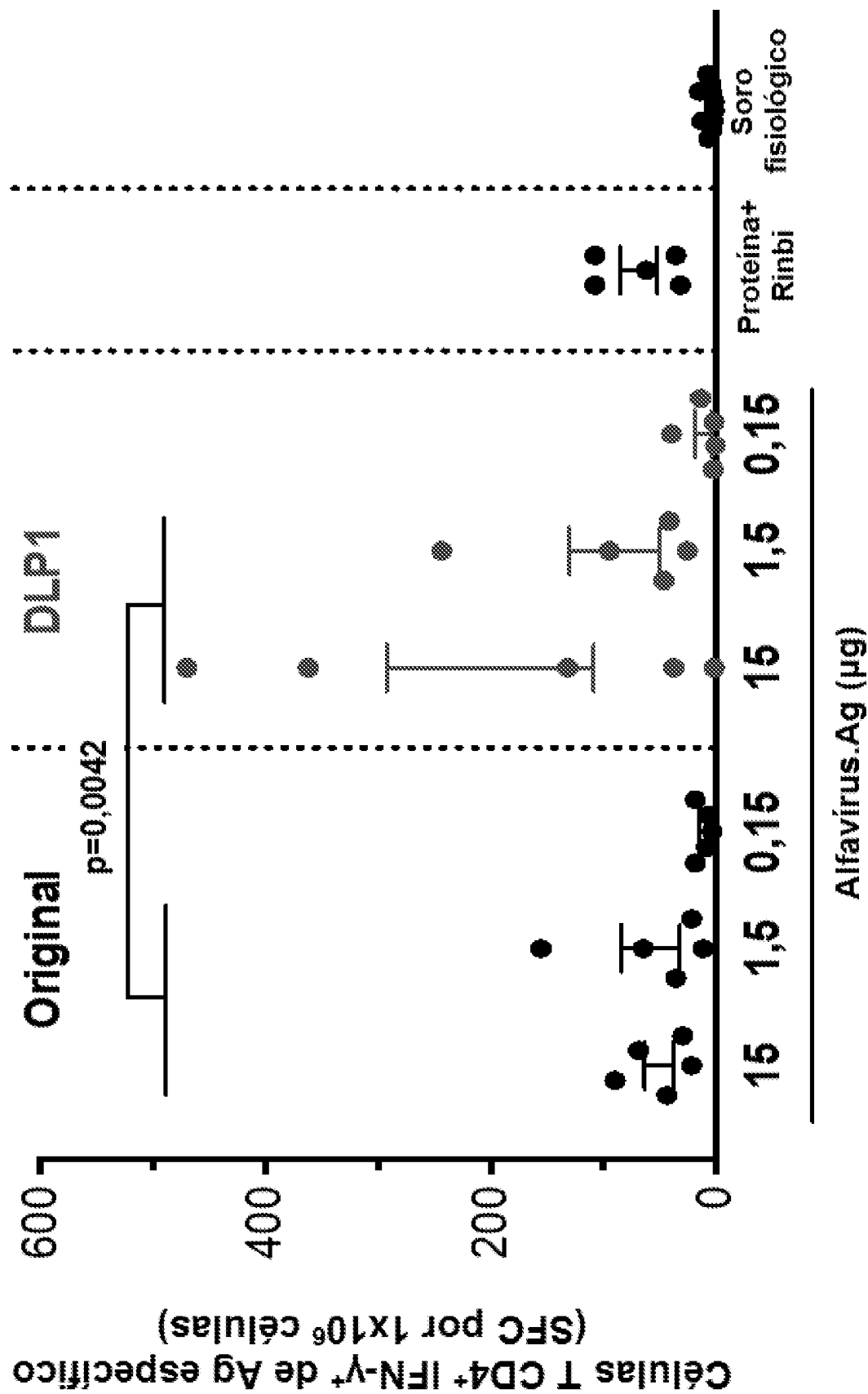


FIG. 12C

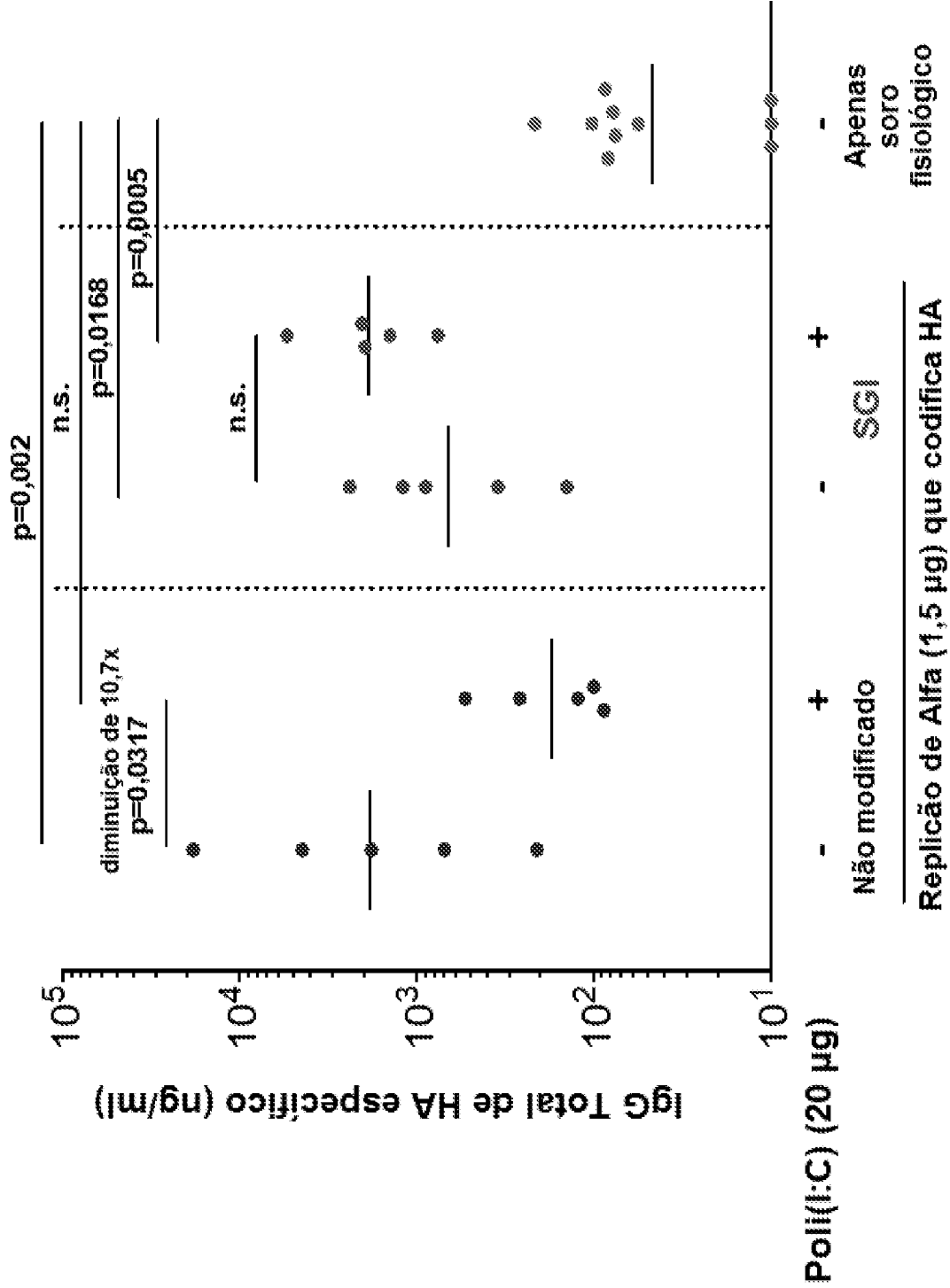


FIG. 13

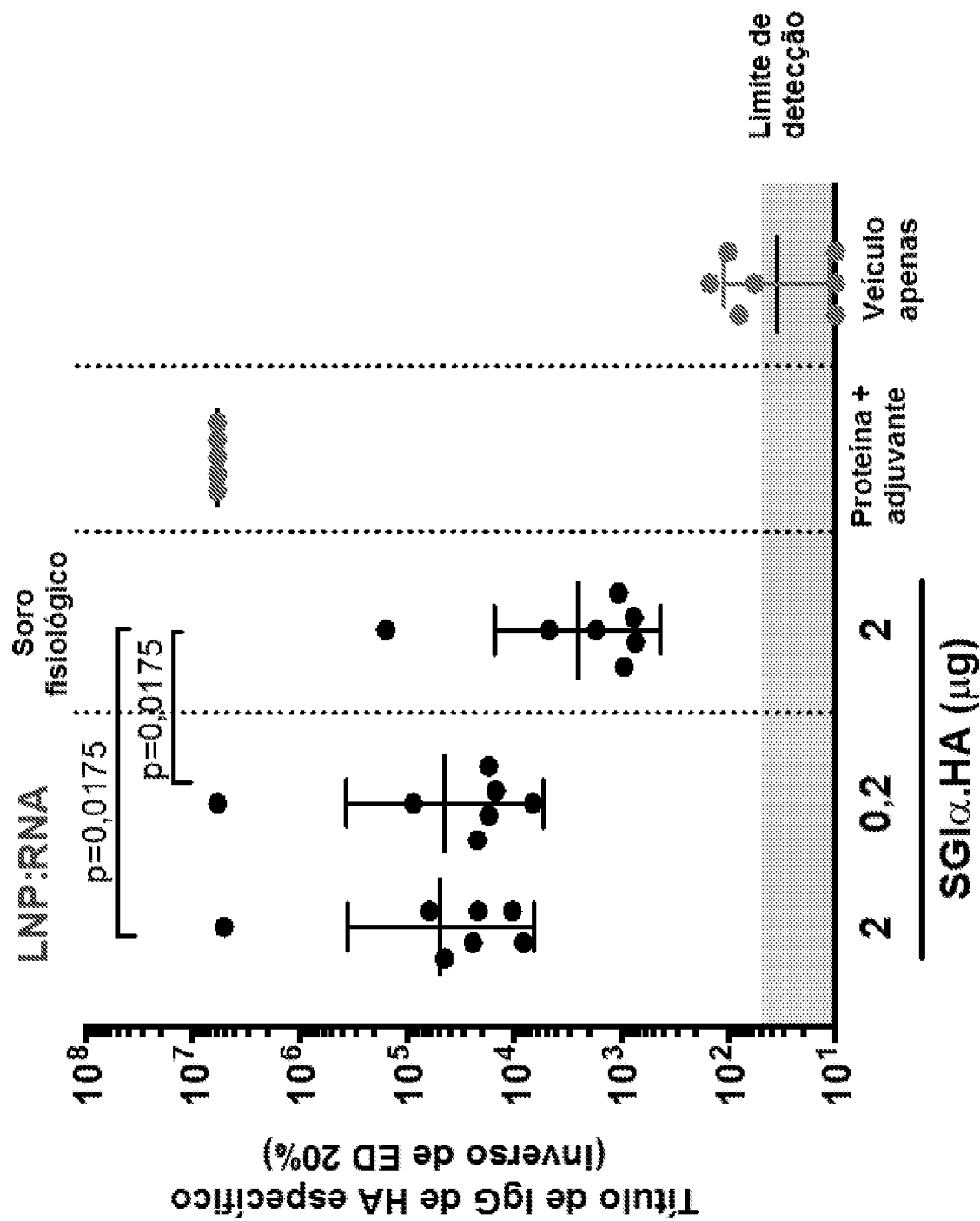


FIG. 14A

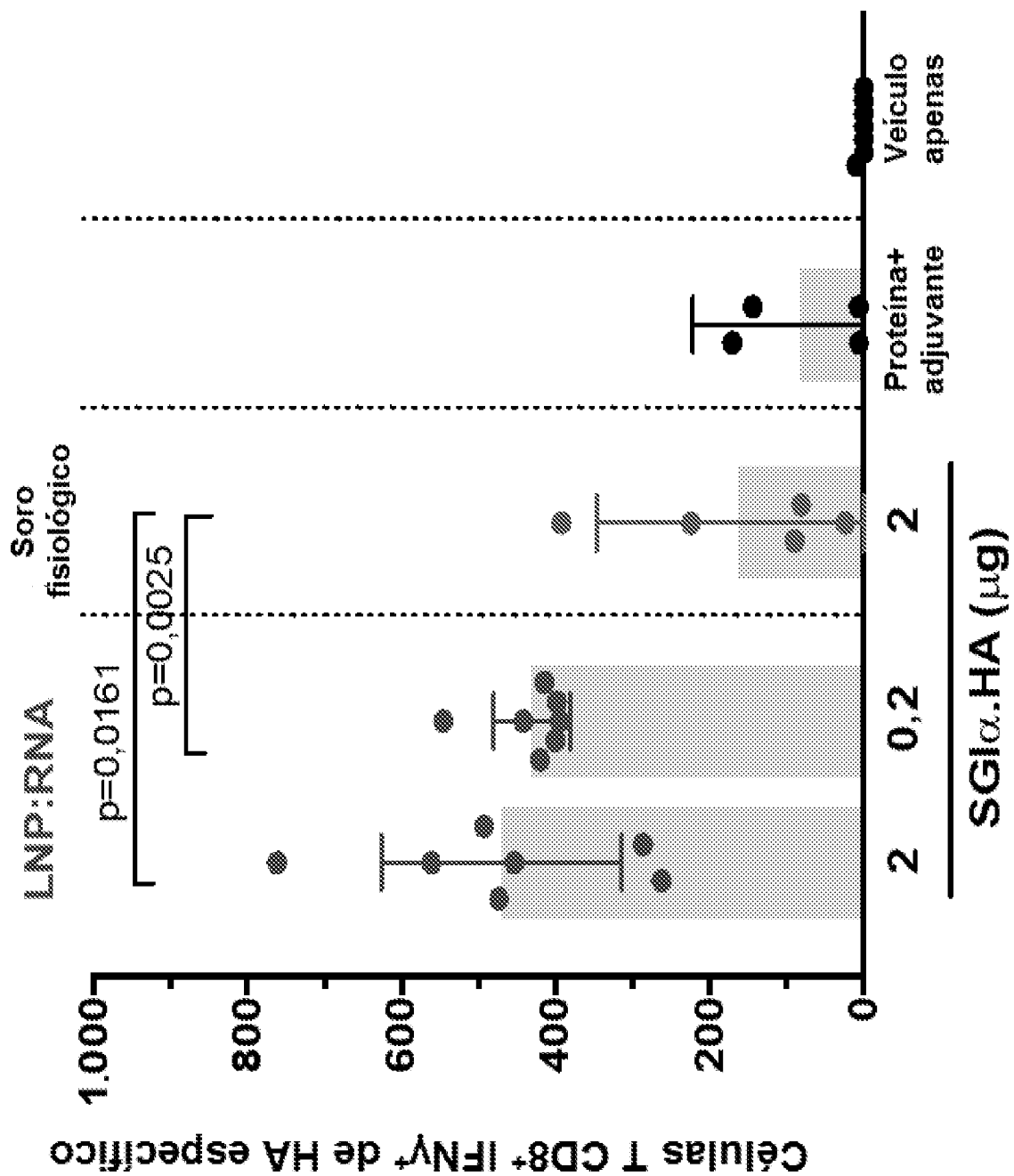


FIG. 14B

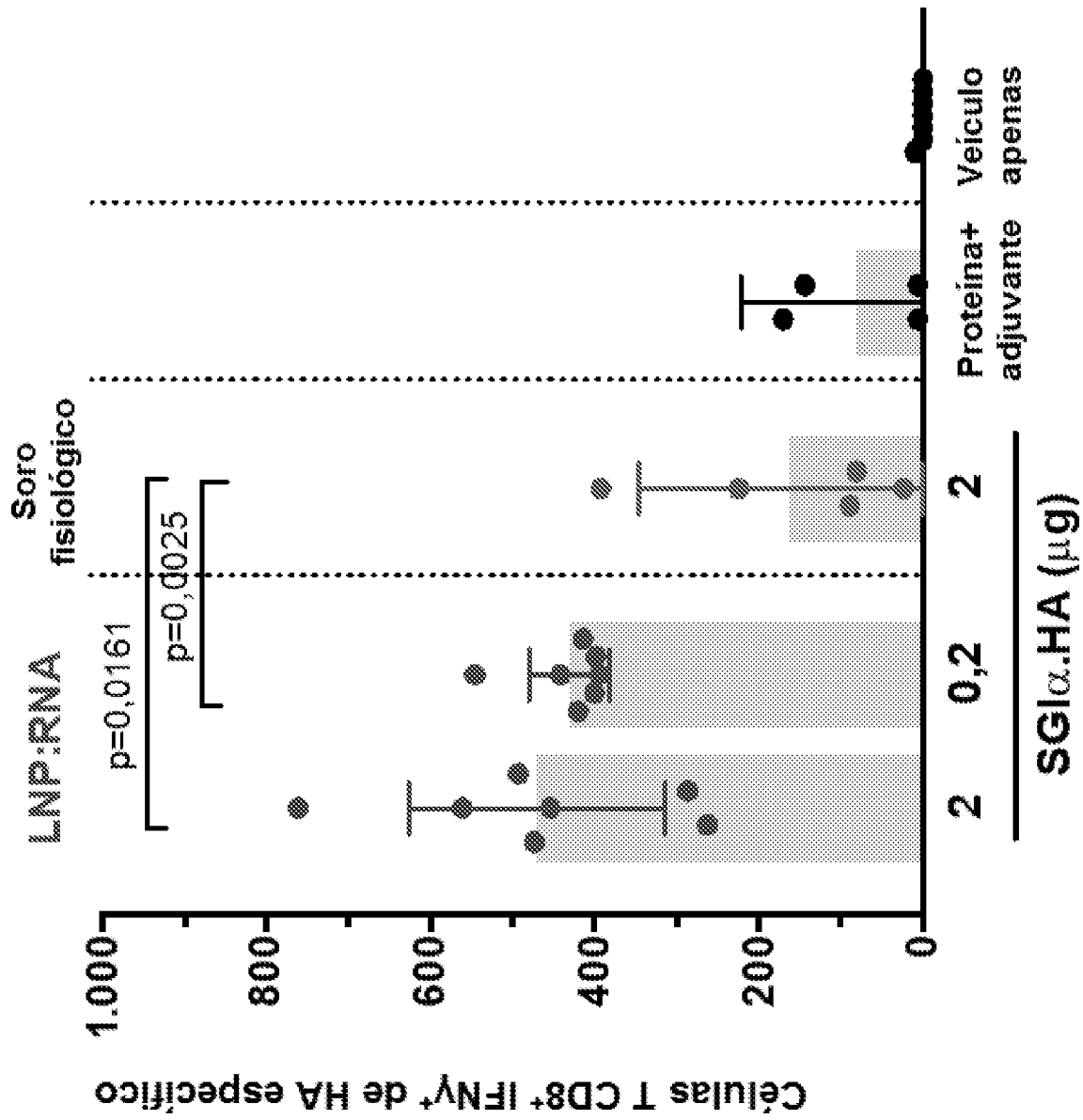


FIG. 14C

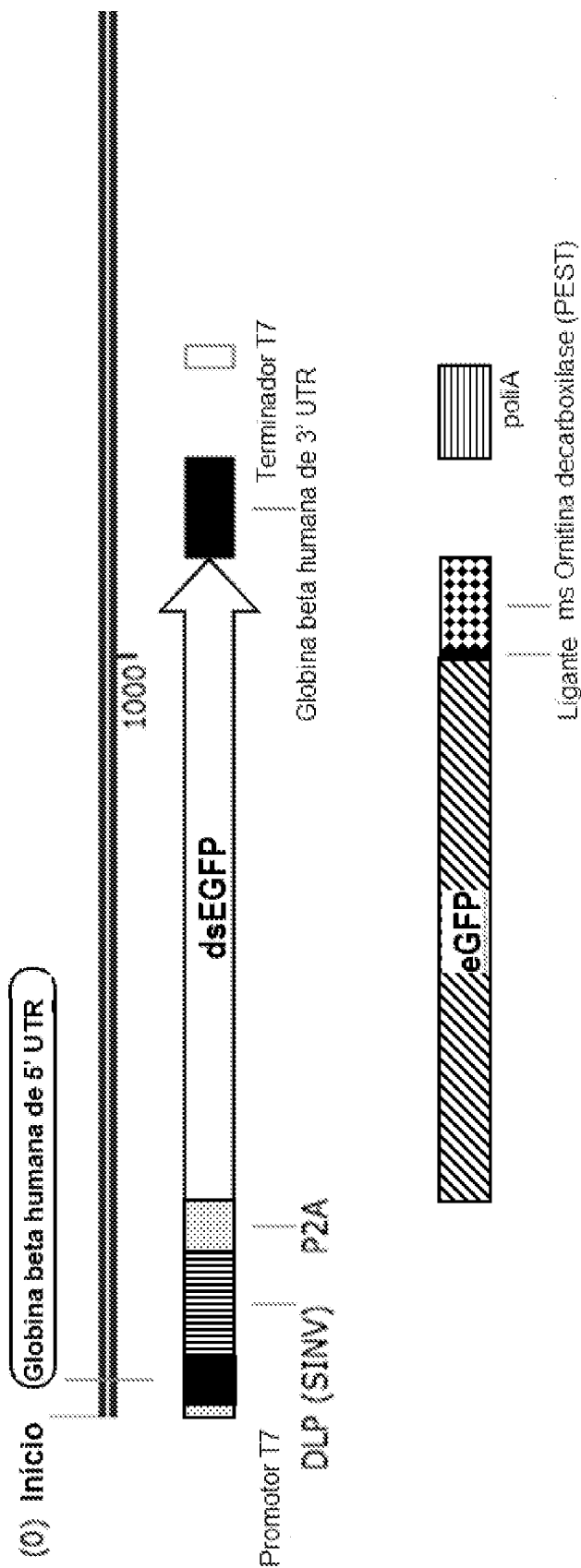


FIG. 15

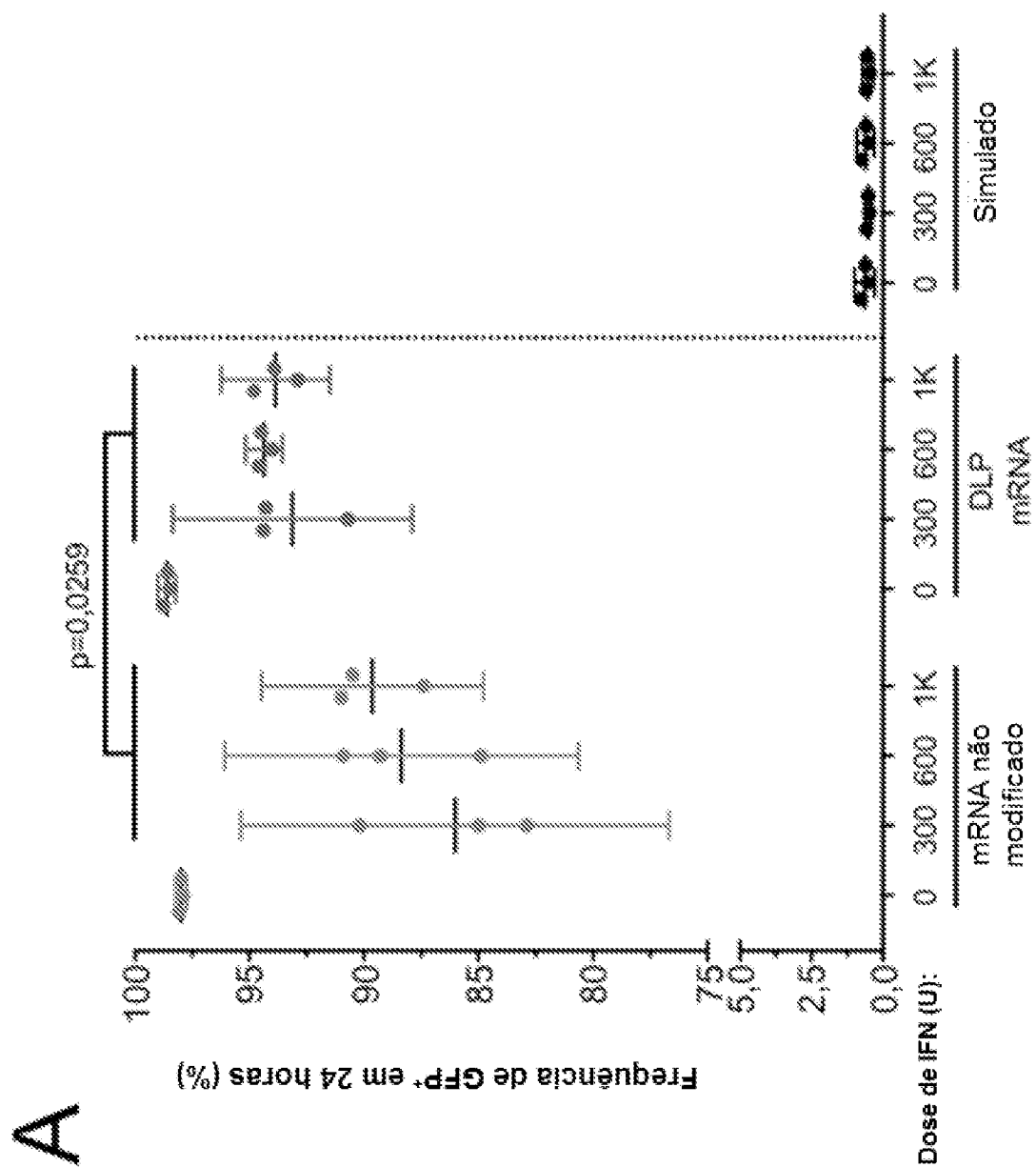


FIG. 16A

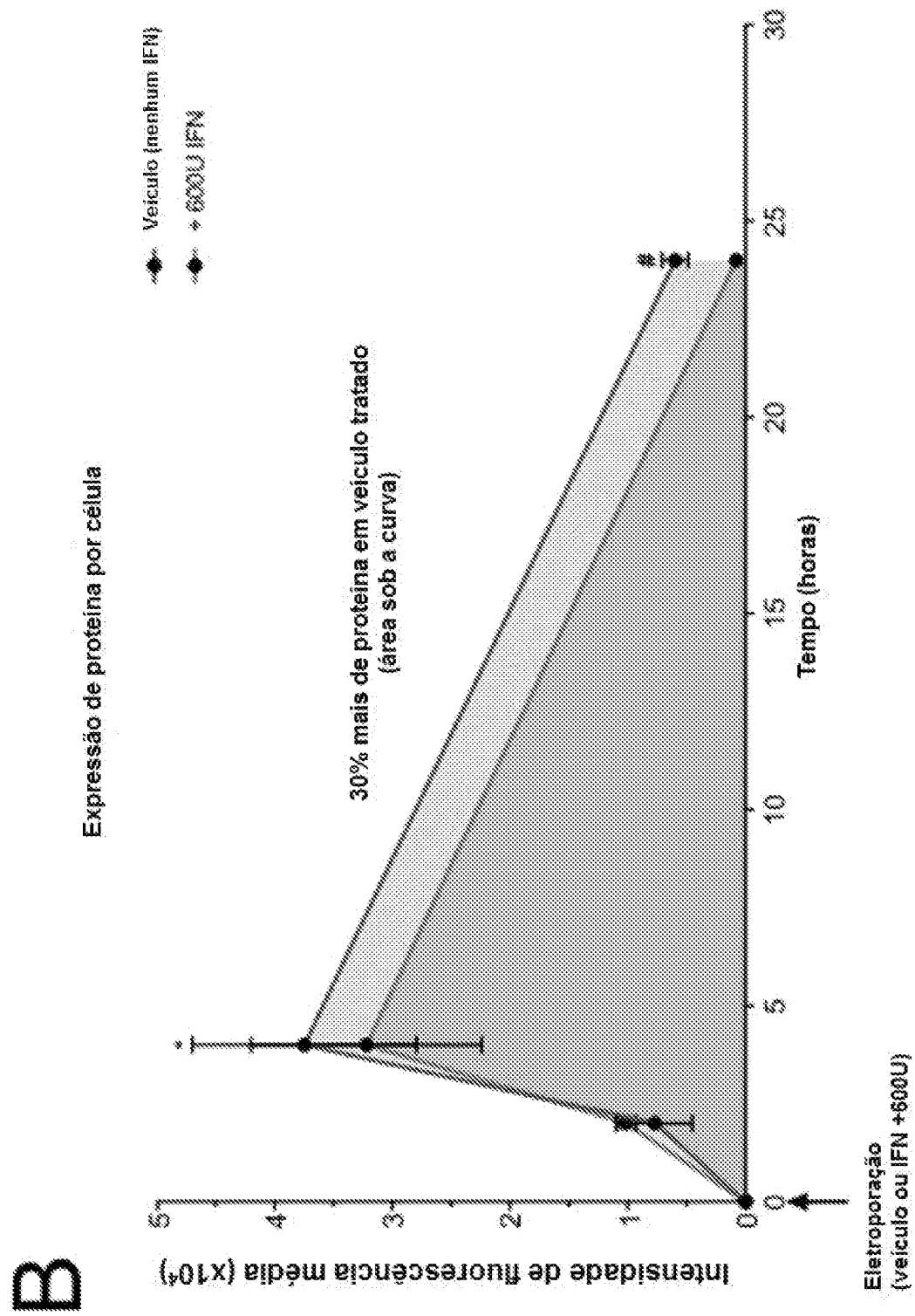


FIG. 16B

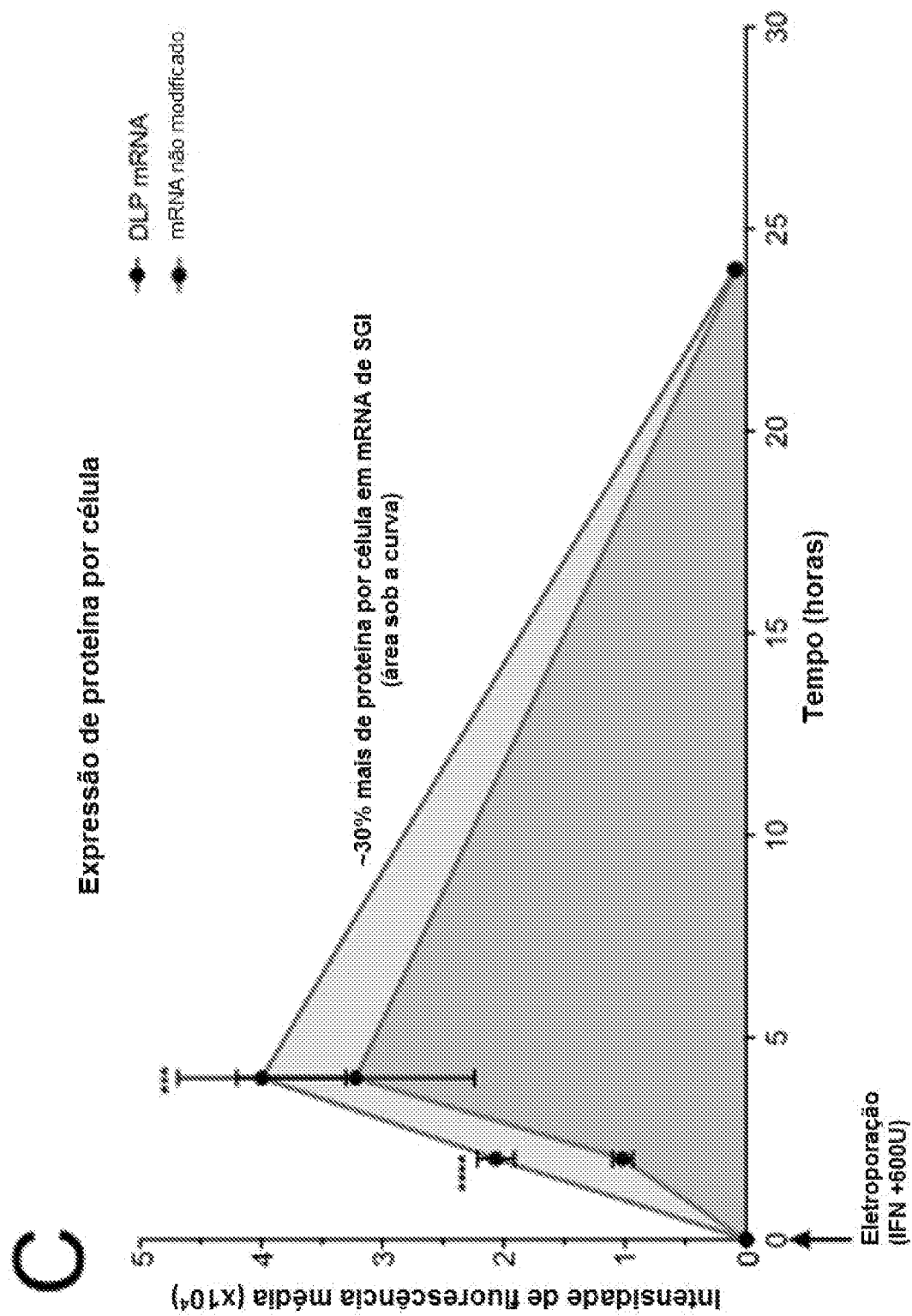


FIG. 16C

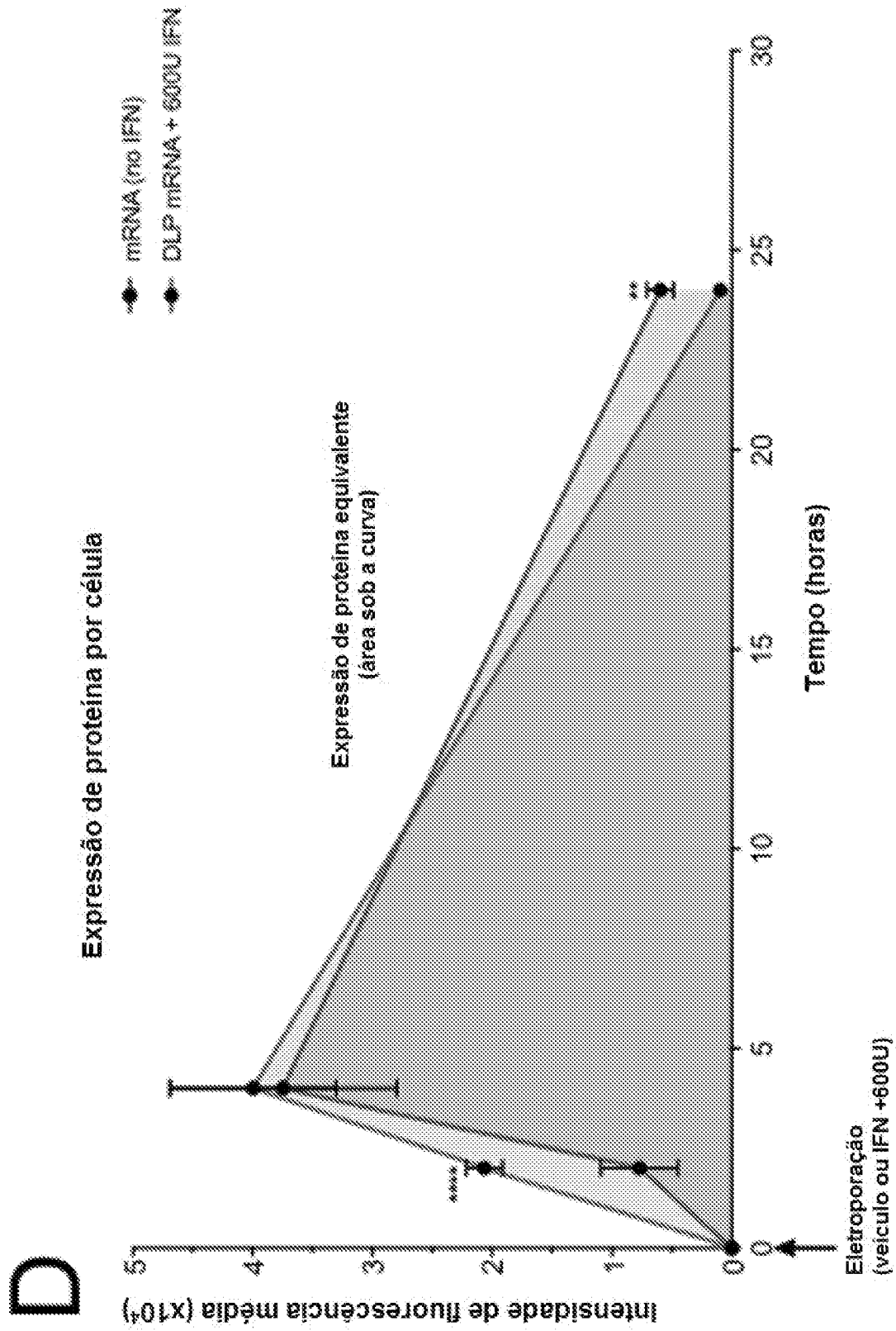


FIG. 16D

**“COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA AUMENTAR
EXPRESSÃO DE GENE”**

RESUMO

A presente revelação se refere em geral a moléculas de ácido nucleico para uso na regulação da expressão genética. O revelado neste documento inclui moléculas de ácido nucleico contendo um ou mais elementos estruturais do potenciador de capsídeo viral ligado de forma operacional a uma sequência de codificação de um gene de interesse. Em algumas realizações, o potenciador de capsídeo viral compreende um *Loop A* jusante (DLP) de uma proteína de capsídeo viral ou uma variante do DLP.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P242276 ListSeq (1.5 - RPI 2546).txt
- Data de Geração do Código: 19/12/2019
- Hora de Geração do Código: 09:10:07
- Código de Controle:
 - Campo 1: 756C520ACE515DC8
 - Campo 2: 990F8816707D92E9