



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

(11) PI 0408424-1 B1



(22) Data do Depósito: 19/03/2004

(45) Data de Concessão: 01/12/2020

(54) Título: ÁCIDO NUCLEICO DE REPLICON RECOMBINANTE, POPULAÇÃO DE PARTÍCULAS DE ALFA-VÍRUS INFECCIOSAS E DEFEITUOSAS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PARTÍCULA DE ALFA-VÍRUS, CÉLULA MICROBIANA E MÉTODO IN VITRO PARA PRODUIR PARTÍCULAS DE ALFA-VÍRUS INFECCIOSAS E DEFEITUOSAS

(51) Int.Cl.: C12N 15/86; C07K 14/18; A61K 35/76.

(30) Prioridade Unionista: 20/03/2003 US 60/456,196.

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

(72) Inventor(es): JON O. RAYNER; KURT KAMRUD; JONATHAN F. SMITH.

(86) Pedido PCT: PCT US2004008458 de 19/03/2004

(87) Publicação PCT: WO 2004/085660 de 07/10/2004

(85) Data do Início da Fase Nacional: 16/09/2005

(57) Resumo: ÁCIDO NUCLEICO, POPULAÇÃO DE PARTÍCULAS DE ALFA-VÍRUS INFECCIOSAS E DEFEITUOSAS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PARTÍCULA DE ALFA-VÍRUS, MÉTODO PARA PRODUIR PARTÍCULAS DE ALFA-VÍRUS INFECCIOSAS E DEFEITUOSAS, CÉLULA, E, MÉTODO PARA ELICIAR UMA RESPOSTA IMUNE EM UM INDIVÍDUO A presente invenção provê um ácido nucleico recombinante, caracterizado pelo fato de compreender: uma primeira seqüência de ácido nucleico codificando uma seqüência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5'; pelo menos uma segunda seqüência de ácido nucleico, codificando uma proteína não-estrutural de alfa-vírus; pelo menos um promotor subgenômico de alfa-vírus; pelo menos um elemento IRES; pelo menos um ácido nucleico heterólogo; e um terceiro ácido nucleico codificando uma seqüência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3'. Além disso, são providos métodos de produzir partículas de alfa-vírus, compreendendo um ácido nucleico recombinante desta invenção e métodos de utilizar as composições desta invenção. É também provido um ácido nucleico auxiliar recombinante, compreendendo: uma primeira seqüência de ácido nucleico, codificando uma seqüência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5'; um promotor subgenômico de alfa-vírus; um elemento IRES; um segundo ácido nucleico codificando uma proteína estrutural de alfa-vírus; e um terceiro ácido nucleico codificando uma seqüência de reconhecimento de replicação (...).

“ÁCIDO NUCLEICO DE REPLICON RECOMBINANTE, POPULAÇÃO DE PARTÍCULAS DE ALFA-VÍRUS INFECCIOSAS E DEFEITUOSAS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PARTÍCULA DE ALFA-VÍRUS, CÉLULA MICROBIANA E MÉTODO IN VITRO PARA PRODUZIR PARTÍCULAS DE ALFA-VÍRUS INFECCIOSAS E DEFEITUOSAS”

PEDIDOS RELACIONADOS

[001] O presente pedido reivindica o benefício, sob 35 U.S.C. § 119(e), do pedido provisório U.S. número de série 60/456.196, depositado em 20 de março de 2003, cujo inteiro conteúdo é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente invenção refere-se a construções aperfeiçoadas para e métodos de produzir partículas de alfa-vírus recombinante.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003] Nos eucariotos, dois distintos mecanismos evoluíram nas células para iniciar a tradução. Em um deles, a estrutura metil-7-guanosina (5')pppN, presente na extremidade 5' do mRNA (o “cap”), é reconhecida pelo fator de iniciação eIF4F, que é composto de eIF4E, eIF4G e eIF4A. A formação deste “complexo de pré-iniciação” requer, entre outros fatores, a ação concertada do fator de iniciação eIF2, responsável pela ligação ao tRNA-Met_i iniciador, eIF3, que interage com a subunidade ribossomal 40S (Hershey & Merrick. Translational Control of Gene Expression, págs. 33 – 88, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY 2000).

[004] No mecanismo alternativo, a iniciação de tradução ocorre internamente no transcrito e é mediada por uma sequência interna de elemento de entrada de ribossomo (IRES), que recruta a maquinaria translacional para um códon de iniciação interno do mRNA, com o auxílio de fatores de trans-ação (Jackson. Translational Control of Gene Expression,

págs. 127-184, Cold Spring Harbor Laboratory press, NY 2000). Os elementos IRES têm sido encontrados em numerosos transcritos de vírus que infectam células de vertebrados, invertebrados ou de plantas, bem como em transcritos de genes de vertebrados e invertebrados.

[005] Durante muitas infecções virais, bem como em outras condições de tensão celular, mudanças do estado de fosforilação de eIF2, que diminuem os níveis do complexo ternário eIF2-GTP-tRNA-Met_i, resultam em inibição total da síntese de proteínas. Contrariamente, exclusão específica de iniciação dependente de cobertura depende da modificação da funcionalidade eIF4F (Thompson & Sarnow. *Current Opinion in Microbiology* 3:366 – 370 (2000)).

[006] Os elementos IRES desviam-se da inibição de tradução dependente de cobertura; assim, a tradução dirigida por um elemento IRES é denominada “independente de cobertura”. A iniciação da tradução acionada por IRES prevalece durante muitas infecções virais, tais como, por exemplo, infecção picornaviral (Macejak & Sarnow. *Nature* 353:90-94 (1991)). Sob estas circunstâncias, a iniciação dependente de cobertura é inibida ou severamente comprometida, devido à presença de pequenas quantidades eIF4F funcional. Isto é causado por clivagem ou perda de solubilidade de eIF4G (Gradi e outros, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95:11089 – 11094 (1998)); a desfosforilação 4E-BP (Gingras e outros, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93:5578-5583 (1996)) ou clivagem de proteína de ligação poli(A) (PABP) (Joachims e outros, *Journal of Virology* 73:718-727 (1999)).

[007] Os vetores de alfa-vírus, que expressam um ácido nucleico de interesse (NOI) em níveis variáveis, foram descritos. Todos estes exemplos descrevem modificação dos genes de proteína não-estrutural de alfa-vírus ou do promotor 26S (subgenômico), para regular a replicação ou transcrição de vetores do promotor subgenômico. Exemplos incluem

mutações dos genes de proteínas não-estruturais, que aumentam ou diminuem a transcrição do RNA subgenômico ou alteram a replicação do RNA genômico, resultando em expressão NOI modificada. O controle da expressão de proteína de um vetor de alfa-vírus, no nível de tradução do mRNA subgenômico, não foi descrito anteriormente.

[008] A presente invenção provê vetores de replicon e auxiliar de alfa-vírus, construídos para controlar a expressão de uma ou mais sequências de ácido nucleico heterólogas, no nível de tradução da proteína, via um mecanismo independente de cobertura, sob a direção de um elemento IRES.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[009] Em uma forma de realização, a presente invenção provê um ácido nucleico de replicon recombinante, compreendendo: uma primeira sequência de ácido nucleico codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5', pelo menos uma segunda sequência de ácido nucleico codificando uma proteína não-estrutural de alfa-vírus, pelo menos um promotor subgenômico de alfa-vírus, pelo menos um elemento IRES, pelo menos um ácido nucleico heterólogo e um terceiro ácido nucleico codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3' e um sinal de acondicionamento de alfa-vírus, que permite que o replicon seja incluído dentro das partículas.

[010] Em outra forma de realização, a presente invenção provê um ácido nucleico auxiliar recombinante, compreendendo: uma primeira sequência de ácido nucleico codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5', um promotor subgenômico de alfa-vírus, um elemento IRES, um ácido nucleico codificando uma ou mais do que uma proteína estrutural de alfa-vírus e um terceiro ácido nucleico codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3'.

[011] Também é provida aqui uma partícula de alfa-vírus,

compreendendo um RNA de replicon de alfa-vírus, compreendendo o ácido nucleico de replicon recombinante desta invenção. Em uma outra forma de realização, é aqui provida uma população de partículas de alfa-vírus infecciosas e defeituosas, em que cada partícula contém um RNA de replicon de alfa-vírus, compreendendo um ácido nucleico de replicon recombinante desta invenção. Em algumas formas de realização, a invenção provê uma população de partículas de alfa-vírus infecciosas e defeituosas, em que cada partícula contém um RNA de replicon de alfa-vírus compreendendo um ácido nucleico de replicon recombinante desta invenção, e a população não tem vírus competente de replicação detectáveis, conforme medido por passagem em cultura de célula. Em formas de realização específicas, as partículas desta invenção podem conter uma ou mais mutações atenuantes.

[012] Além disso, são incluídas composições farmacêuticas que compreendem as partículas e populações desta invenção em um veículo farmacêuticamente aceitável.

[013] Em outras formas de realização, a presente invenção provê um método para produzir partículas de alfa-vírus infecciosas e defeituosas, compreendendo: (a) introduzir em uma população de células (i) um ácido nucleico de replicon recombinante desta invenção; e (ii) um ou mais ácido(s) nucleico(s) auxiliar(es) codificando proteínas estruturais de alfa-vírus; em que todas as proteínas estruturais de alfa-vírus são providas nas células; e (b) produzir ditas partículas de alfa-vírus na população de células. O método desta invenção pode compreender ainda a etapa de coletar ditas partículas de alfa-vírus das células.

[014] Em algumas formas de realização, o ácido nucleico auxiliar desta invenção pode também ser um ácido nucleico de replicon recombinante desta invenção. Por exemplo, um ácido nucleico recombinante desta invenção pode compreender, como um ácido nucleico heterólogo e/ou além de um ácido nucleico heterólogo, uma sequência de ácido nucleico

codificando uma proteína estrutural de alfa-vírus ou mais do que uma proteína estrutural de alfa-vírus. Em tais formas de realização, o ácido nucleico de replicon recombinante é considerado ser um ácido nucleico auxiliar de replicon recombinante, que pode estar presente em uma célula com outros ácidos nucleicos auxiliares e/ou outros ácidos nucleicos recombinantes desta invenção.

[015] Assim, em uma forma de realização específica, o ácido nucleico de replicon recombinante desta invenção codifica ainda uma proteína estrutural de alfa-vírus ou mais do que uma proteína estrutural de alfa-vírus. Este ácido nucleico de replicon recombinante pode ser introduzido dentro de uma população de células, junto com um ou mais ácidos nucleicos auxiliares, de modo que o ácido nucleico de replicon recombinante e o(s) ácido(s) nucleico(s) auxiliar(es) produzem todas as proteínas estruturais de alfa-vírus e o ácido nucleico de replicon recombinante é acondicionado dentro de partículas de ditas células.

[016] São adicionalmente providos métodos de eliciar uma resposta imune em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade imunogênica das populações e/ou composições de ácidos nucleicos, vetores e partículas desta invenção.

[017] Em outras formas de realização, a presente invenção provê um ácido nucleico recombinante compreendendo: um promotor que dirige a transcrição de um ácido nucleico; um elemento IRES; e um ácido nucleico compreendendo uma sequência codificante, em que o elemento IRES é operavelmente localizado, de modo que a tradução da sequência codificante é via um mecanismo independente de cobertura, dirigido pelo elemento IRES e não via um mecanismo dependente de cobertura.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[018] A Figura 1 mostra um northern blot dos RNAs subgenômicos de replicon de IRES-espaçador.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[019] Como aqui usado, “um”, “uma” e “o”, “a”, podem significar um ou mais do que um, dependendo do contexto em que for usado. Como exemplos, “uma célula” pode significar uma célula ou múltiplas células; e “um ácido nucleico heterólogo” pode significar um ácido nucleico heterólogo ou múltiplos ácidos nucleicos heterólogos.

[020] A presente invenção é baseada na verificação surpreendente e inesperada de que a transcrição de um ácido nucleico e tradução do ácido nucleico podem ser desacopladas. Assim, em uma forma de realização, a presente invenção provê um ácido nucleico recombinante compreendendo: um promotor que dirige a transcrição; um elemento IRES; e uma sequência codificadora, em que o elemento IRES é operavelmente localizado, de modo que a tradução da sequência codificadora é via um mecanismo independente de cobertura, dirigido pelo elemento IRES e não via um mecanismo dependente de cobertura. Para fins desta invenção, o termo “transcrição” inclui a produção de RNA de um promotor subgenômico de alfa-vírus de um ácido nucleico de replicon recombinante, que pode ele próprio ser uma molécula de RNA. Isto é, o promotor subgenômico de uma molécula de RNA de replicon recombinante desta invenção pode dirigir a transcrição de um RNA mensageiro, codificando um NOI heterólogo. Separadamente, o ácido nucleico de replicon recombinante pode ser “replicado”, isto é, copiado da sequência de reconhecimento de replicação 5’ diretamente para a sequência de reconhecimento de replicação 3’.

[021] Em outras formas de realização, a presente invenção provê um ácido nucleico de replicon recombinante compreendendo: uma primeira sequência de ácido nucleico codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5’, pelo menos uma segunda sequência de ácido nucleico codificando uma proteína não-estrutural de alfa-vírus, pelo menos um promotor subgenômico de alfa-vírus, pelo menos um

elemento IRES, pelo menos um ácido nucleico heterólogo e um terceiro ácido nucleico codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3'. Em certas formas de realização, o ácido nucleico de replicon recombinante compreende ainda um sinal de acondicionamento de alfa-vírus, de modo que o replicon pode ser acondicionado dentro de partículas. Em outras formas de realização, o ácido nucleico de replicon recombinante pode compreender uma sequência de ácido nucleico de espaçador, que pode ser localizada a montante de um elemento IRES.

[022] Entende-se que, nas várias formas de realização, os elementos do ácido nucleico de replicon recombinante desta invenção podem estar presentes na ordem listada aqui e/ou presentes em qualquer ordem. Assim, por exemplo, em uma forma de realização, a presente invenção provê um ácido nucleico de replicon recombinante, compreendendo, na seguinte ordem: uma primeira sequência de ácido nucleico codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5', pelo menos uma segunda sequência de ácido nucleico codificando uma proteína não-estrutural de alfa-vírus, pelo menos um promotor subgenômico de alfa-vírus, pelo menos um elemento IRES, pelo menos um ácido nucleico heterólogo e um terceiro ácido nucleico codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3'.

[023] Como aqui usado, uma "sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5'" e "sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3'" são sequências 5' e 3' (as designações 5' e 3' referindo-se a suas localizações no ácido nucleico de alfa-vírus), que controlam a replicação de um genoma de alfa-vírus. Em certas formas de realização, uma ou outra ou ambas as sequências de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5' e 3' podem ser truncadas em uma ou outra extremidade, desde que sua função na replicação de um genoma de alfa-vírus permaneça intacta.

[024] Também como aqui usado, “pelo menos uma segunda sequência de ácido nucleico, codificando uma proteína não-estrutural de alfa-vírus”, inclui uma sequência de ácido nucleico que codifica pelo menos uma e, possivelmente, mais do que uma proteína não-estrutural de alfa-vírus. Por exemplo, uma segunda sequência de ácido nucleico desta invenção pode ser uma sequência de ácido nucleico contígua, codificando as proteínas não estruturais de alfa-vírus nsp1, nsp2, nsp3 e nsp4, uma sequência de nucleotídeo contígua, codificando as proteínas não estruturais de alfa-vírus nsp1, nsp2 e nsp3, um ácido nucleico contíguo, codificando as proteínas não estruturais de alfa-vírus nsp2, nsp3 e nsp4, um ácido nucleico contíguo codificando as proteínas não estruturais de alfa-vírus nsp1 e nsp2, um ácido nucleico contíguo codificando proteínas não estruturais de alfa-vírus nsp3 e nsp4, um ácido nucleico contíguo codificando proteínas não estruturais de alfa-vírus nsp2 e nsp3, um ácido nucleico codificando a proteína não-estrutural de alfa-vírus nsp1, um ácido nucleico codificando a proteína não-estrutural de alfa-vírus nsp2, um ácido nucleico codificando a proteína não-estrutural de alfa-vírus nsp3, um ácido nucleico codificando a proteína não-estrutural de alfa-vírus nsp4 e/ou qualquer combinação e/ou ordem delas, de modo que o ácido nucleico de replicon recombinante compreende sequências de nucleotídeo codificando nsp1, nsp2, nsp3 e nsp4, no total.

[025] Em formas de realização particulares, o ácido nucleico de replicon recombinante desta invenção pode compreender ácido nucleico codificando uma ou mais proteínas não estruturais de alfa-vírus em qualquer combinação e em qualquer local em relação entre si, de modo que o ácido nucleico de replicon recombinante compreende sequências de nucleotídeo codificando nsp1, nsp2, nsp3 e nsp4 no total. Por exemplo, um ácido nucleico de replicon recombinante desta invenção pode compreender, na seguinte ordem: uma primeira sequência de ácido nucleico codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5’, uma

segunda sequência de ácido nucleico, codificando a proteína não-estrutural de alfa-vírus nsp1, nsp2, e nsp3, pelo menos um promotor subgenômico de alfa-vírus, pelo menos um elemento IRES, pelo menos um ácido nucleico heterólogo, outra segunda sequência de ácido nucleico codificando a proteína não-estrutural de alfa-vírus nsp4 e um terceiro ácido nucleico codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3’.

[026] Como também aqui usado, um “promotor subgenômico de alfa-vírus”, “promotor subgenômico” ou “promotor 26S” é um promotor presente em um genoma de alfa-vírus que dirige a transcrição de uma mensagem subgenômica em um processo de replicon de alfa-vírus normal. O promotor subgenômico de alfa-vírus pode ser truncado (por exemplo, para produzir um promotor subgenômico de alfa-vírus mínimo) e/ou modificado, de modo que sua atividade é reduzida, mantida ou aumentada, de acordo com métodos conhecidos na técnica.

[027] Os ácidos nucleicos recombinantes desta invenção podem compreender um elemento de sequência de entrada de ribossomo interna (IRES), que dirige a tradução de um ácido nucleico para dentro de uma proteína, via um mecanismo independente de cobertura, como aqui descrito e como é bem conhecido na técnica. Em particular nos ácidos nucleicos de replicon recombinantes da presente invenção, o controle da expressão do nitrogênio no nível de tradução é realizado introduzindo-se um sítio de entrada de ribossomo interno (IRES) a jusante de um promotor subgenômico 26S de alfa-vírus e a montante da sequência codificadora a ser transladada. O elemento IRES é posicionado de modo a dirigir a tradução do mRNA, desse modo minimizando, limitando ou evitando o início da tradução do mRNA da estrutura metil-7-guanosina (5’)pppN presente na extremidade 5’ do mRNA subgenômico (o “cap”). Esta tradução independente de cobertura, “dirigida por IRES”, não requer ou resulta em qualquer modificação significativa de genes de proteína não-estrutural de alfa-vírus,

que poderiam alterar a replicação e transcrição.

[028] Os vetores de alfa-vírus, designados para controlar o nível de expressão de um ácido nucleico heterólogo, sem modular (por exemplo, perturbar, transtornar, romper, aumentar, intensificar, reduzir, minimizar) a replicação do genoma ou transcrição subgenômica, têm diversas vantagens em relação aos propósitos de vetores anteriores. Primeiro, a modulação da replicação do genoma pode negativamente afetar a geração VRP, limitando o número de RNAs genômicos disponíveis para acondicionamento dentro das partículas. Segundo, a modulação da transcrição subgenômica, alterando-se (por exemplo, por truncagem, deleção, adição e/ou substituição) o promotor 26S, pode alterar a replicação do RNA genômico, novamente resultando na limitação do número de RNAs genômicos disponíveis para acondicionamento dentro das partículas. Terceiro, a replicação de alfa-vírus induz uma resposta de estresse nas células, que pode resultar em tradução dependente de cobertura reduzida de mRNAs. A comutação de tradução dependente de cobertura, de um mRNA subgenômico de alfa-vírus, para o mecanismo dependente de cobertura provido por um elemento IRES, minimiza este efeito negativo sobre a expressão NOI.

[029] Um elemento IRES da presente invenção pode incluir mas não é limitado a elementos IRES virais de picornavírus, por exemplo, poliovírus (PV) ou o enterovírus 71 humano, por exemplo, cepas 7423/MS/87 e BrCr deles; do vírus da encefalomiocardite (EMCV); do vírus da febre aftosa (FMDV); do flavivírus, por exemplo, vírus da hepatite C (HCV); de pestivírus, por exemplo, vírus da febre suína clássica (CSFV); de retrovírus, por exemplo, vírus da leucemia de murinos (MLV); de lentivírus, por exemplo, vírus da imunodeficiência dos símios (SIV); de elementos IRES de mRNA celular, tais como aqueles dos fatores de iniciação de tradução, por exemplo, eIF4G ou DAP5; de fatores de transcrição, por exemplo, c-Myc (Yang e Sarnow, *Nucleic Acids Research* 25: 2800 – 2807 (1997)) ou fator de

repressão de NF- κ B (NRF); de fatores de crescimento, por exemplo, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF-2) e fator de crescimento B derivado de plaqueta (PDGF B); de genes homeóticos, por exemplo, Antennapedia; de proteínas de sobrevivência, por exemplo, inibidor ligado-X de apoptose (XIAP) ou Apaf-1; de acompanhantes, por exemplo, proteína de ligação de cadeia pesada de imunoglobulina BiP (Martinez-Salas e outros, Journal of General Virology 82: 973-984 (2001)), de vírus de plantas, bem como quaisquer outros elementos IRES agora conhecidos ou posteriormente identificados.

[030] Em certas formas de realização, o elemento IRES desta invenção pode ser derivado de, por exemplo, vírus da encefalomiocardite (EMCB, acesso ao GenBank # NC001479), vírus da paralisia do grilo (acesso GenBank # AF218039), vírus dae *Drosophila* C (acesso GenBank # AF014388), vírus do intestino *Plautia stali* (acesso GenBank # AB006531), vírus *Rhopalosiphum padi* (acesso GenBank # AF022937), vírus Himetobi P (acesso GenBank # AB017037), vírus da paralisia de abelha aguda (acesso GenBank # AF150629), vírus da célula da abelha mestra Negra (acesso GenBank # AF183905), vírus *Triatoma* (acesso GenBank # AF178440), vírus *Acyrtosiphon psum* (acesso GenBank # AF024514), vírus *flacherie* infeccioso (acesso GenBank # AB000906) e/ou vírus *Sacbood* (acesso GenBank # AF092924). Além disso, a presente invenção provê um elemento IRES sintético, que pode ser projetado, de acordo com métodos conhecidos na técnica, para imitar a função dos elementos IRES naturalmente ocorrentes (vide Chappell e outros, Proc.Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97(4): 1536 – 41).

[031] Em formas de realização específicas, o elemento IRES pode ser um elemento IRES de inseto ou outro elemento IRES de não-mamífero, que seja funcional na linhagem de célula auxiliar particular, escolhida para acondicionamento das partículas de alfa-vírus recombinante

desta invenção, porém não seja funcional ou seja minimamente funcional em uma célula hospedeira alvo. Os elementos IRES de vírus de inseto evoluíram para funcionar otimamente dentro de células de inseto e similarmente as sequências IRES de vírus de mamífero funcionam otimamente em células de mamífero. Assim, o controle da tradução pode ser introduzido dentro dos sistemas vetores de replicon, pela inserção de elementos IRES específicos de vírus dentro de RNAs de replicon. Desta maneira, a tradução de NOIs heterólogos de vetores de replicon pode ser regulada (atenuada) em células de mamífero e aumentada dentro de células de insetos. Isto é útil para aqueles NOIs que são tóxicos para a célula condicionante ou são prejudiciais para o processo de condicionamento de alfa-vírus. Uma maneira alternativa de se conseguir este efeito é utilizar um elemento IRES de mamífero no vetor de replicon, que esteja condicionado em um sistema de cultura de células de insetos, desse modo também evitando-se tradução possivelmente significativas do NOI heterólogo, durante o condicionamento. Sem ficarmos presos a uma hipótese ou teoria particular, fatores celulares e ambiente de cultura podem representar um papel na atividade e função de IRES. Portanto, antecipamos que níveis adicionais de controle/regulação de diferentes espécies de IRES, dentro da mesma célula, podem ser conseguidos através do suprimento/remoção de certos fatores celulares ou por mudanças do ambiente de cultura (por exemplo, temperatura), para preferencialmente dirigir a tradução para um IRES, em comparação com um segundo.

[032] Em algumas formas de realização, o ambiente celular da linhagem de célula auxiliar ou condicionadora pode ser alterado, de modo que uma atividade específica do IRES seja aumentada ou reduzida. Tipicamente, os elementos IRES evoluíram para funcionar sob condições de estresse celular, onde níveis aumentados de cinases eIF-2alfa resultam em reduzida tradução dependente de cobertura e em um aumento recíproco da tradução/atividade dependente de IRES. Tais condições podem ser

artificialmente induzidas em um sistema de condicionamento celular, de modo a aumentar a expressão dos elementos IRES escolhidos por uma variedade de métodos, incluindo mas não limitado a hipoxia, hipotermia, fome de amino ácido/nutricional, indução de estresse ER (por exemplo, utilizando-se Thapsigargina), indução de interferon ou elementos PKR (por exemplo, utilizado-se poli IC), bloqueio de síntese dependente de tRNA (por exemplo, utilizando-se Edeine) ou outros tensionadores gerais conhecidos na técnica, incluindo mas não limitado a peróxido de hidrogênio e sorbitol.

[033] Em outras formas de realização, a tradução dirigida-elemento IRES de NOI pode ser modulada, por exemplo, através do uso de siRNAs anti-sentido, específicos para o elemento/espaçador IRES ou NOI, que podem ser transfectados para dentro ou transduzidos/transitoriamente expressos dentro da célula condicionadora, por numerosos métodos padrão conhecidos na técnica e aqui descritos.

[034] Como outra alternativa, a expressão de NOI pode também ser modulada pelo uso de pares de ligação de ligando, por exemplo, um elemento de ácido nucleico e uma molécula (isto é, ligando) que se liga a ele (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 6.242.259). Portanto, a presente invenção também provê um ácido nucleico de replicon recombinante, compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5', uma ou mais segunda(s) sequência(s) de ácido nucleico codificando uma proteína não-estrutural de alfa-vírus, pelo menos um promotor subgenômico de alfa-vírus, pelo menos um elemento IRES, uma sequência de nucleotídeo não-alfa-vírus que, quando ligada por um ligando, altera a transcrição do RNA subgenômico e/ou tradução do IRES, pelo menos um ácido nucleico heterólogo e um ácido nucleico codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3'.

[035] Como uma forma de realização específica, o ligando

pode ser uma proteína de ligação de RNA (por exemplo, proteína de revestimento R17), uma sequência anti-sentido, um corante (por exemplo, corantes Hoechst H33258 ou H3342) e/ou um antibiótico (por exemplo, tobramicina ou canamicina). Estes podem ser introduzidos dentro ou produzidos dentro das células acondicionadoras por métodos conhecidos daqueles hábeis na técnica (vide Patente U.S. No. 6.242.259).

[036] Como utilizado dentro do contexto da presente invenção, uma redução da transcrição do RNA subgenômico ou uma redução da tradução de um NOI dirigido pelo IRES, devido à ação de um ligando ligando-se a uma sequência de nucleotídeo não-alfa-vírus, localizada em estreita proximidade com o promotor subgenômico de alfa-vírus ou IRES, deve ser entendida referir-se a uma diminuição estatisticamente significativa da transcrição ou tradução, respectivamente, na presença do ligando selecionado. Em algumas formas de realização, o nível da transcrição do RNA subgenômico ou tradução NOI dirigida-IRES nas células é reduzido pelo menos 25%, 50%, 75% ou 90% ou 3-vezes, 5-vezes ou 10-vezes, em comparação com os níveis sem a presença do ligando de ligação. Uma larga variedade de ensaios, que são conhecidos na técnica, pode ser utilizada para avaliar um nível reduzido de transcrição ou tradução, incluindo, por exemplo, ensaios enzimáticos de um gene repórter, northern blot, rotulação de RNA metabólico e similares.

[037] Os ácidos nucleicos de replicon recombinantes desta invenção pode compreender um ou mais elementos IRES e, naquelas formas de realização compreendendo dois ou mais elementos IRES, os elementos IRES podem ser iguais ou podem ser diferentes, em qualquer ordem e/ou combinação. Nestas formas de realização específicas, o ácido nucleico de replicon recombinante pode compreender dois ou mais “cassetes de NOI heterólogo-IRES-promotor”, em que o promotor, IRES e NOI heterólogo, de cada cassete, podem ser diferentes ou iguais. Alternativamente, o ácido

nucleico de replicon recombinante pode codificar dois ou mais NOIs, um dos quais é controlado por um “cassete de promotor-IRES”, enquanto o(s) outro(s) NOI(s) podem ser controlados por um promotor subgenômico sozinho ou por um IRES sozinho.

[038] O ácido nucleico heterólogo desta invenção é um ácido nucleico que não está presente no genoma de um alfa-vírus tipo selvagem e/ou não está presente no genoma de um alfa-vírus tipo selvagem na mesma ordem que ele existe em um ácido nucleico de replicon recombinante desta invenção. Por exemplo, em certas formas de realização, o ácido nucleico heterólogo desta invenção pode codificar uma ou mais proteínas estruturais de alfa-vírus (por exemplo, C, PE2/E2, E1, E3, 6K) e/ou uma ou mais proteínas estruturais de alfa-vírus além de um ácido nucleico heterólogo. Quando o ácido nucleico de replicon recombinante desta invenção compreende ácido nucleico codificando uma ou mais proteínas estruturais de alfa-vírus, o ácido nucleico de replicon recombinante pode funcionar como um ácido nucleico auxiliar de replicon recombinante na montagem das partículas de alfa-vírus infecciosas e defeituosas, como descrito aqui.

[039] O ácido nucleico heterólogo desta invenção pode codificar uma proteína ou peptídeo que pode ser mas não é limitado a um antígeno, um imunógeno ou polipeptídeo ou peptídeo imunogênico, uma proteína de fusão, um peptídeo de fusão, um antígeno de câncer etc. Exemplos de proteínas e/ou peptídeos codificados pelo ácido nucleico heterólogo desta invenção incluem mas não são limitados a polipeptídeos e peptídeos imunogênicos, adequados para proteger um indivíduo contra uma doença, incluindo mas não limitado a doenças microbianas, bacterianas, protozoárias, parasíticas e virais.

[040] Em algumas formas de realização, por exemplo, a proteína ou peptídeo codificado pelo ácido nucleico heterólogo pode ser um imunógeno de ortomixovírus (por exemplo, uma proteína ou peptídeo do

vírus influenza, tal como a proteína de superfície da hemaglutinina (HA) do vírus influenza ou a nucleoproteína do vírus influenza, ou uma proteína ou peptídeo do vírus influenza de eqüinos), ou um imunógeno do vírus parainfluenza, ou um imunógeno do metapneumovírus, ou um imunógeno do vírus sincicial respiratório ou um imunógeno do rinovírus, um imunógeno de lentivírus (por exemplo, uma proteína ou peptídeo do vírus da anemia infecciosa de eqüinos, proteína ou peptídeo de um Vírus da Imunodeficiência de Símios (SIV), ou uma proteína ou peptídeo do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), tais como a proteína GP160 envoltória de HIV ou SIV, as proteínas de capsídeo /matriz HIV ou SIV e os produtos genéticos gag, pol e env de HIV ou SIV). A proteína ou peptídeo pode também ser um imunógeno de arenavírus (por exemplo, proteína ou peptídeo do vírus da febre de Lassa, tal como a proteína de nucleocapsídeo do vírus da febre de Lassa e a glicoproteína envoltória da febre de Lassa), um imunógeno de picornavírus (por exemplo, uma proteína ou peptídeo do vírus da febre aftosa), um imunógeno de poxvírus (por exemplo, uma proteína ou peptídeo da vacínia, tal como a proteína L1 ou L8 da vacínia), ou imunógeno de orbivírus (por exemplo, uma proteína ou peptídeo do vírus da náusea do cavalo africano), um imunógeno de flavivírus (por exemplo, uma proteína ou peptídeo do vírus da febre amarela, uma proteína ou peptídeo do vírus do Nilo Ocidental, ou uma proteína ou peptídeo do vírus da encefalite japonesa), um imunógeno do filovírus (por exemplo, uma proteína ou peptídeo do vírus Ebola, ou uma proteína ou peptídeo do vírus Marburg, tal como proteínas NP e GP), um imunógeno do bunivírus (por exemplo, proteínas ou peptídeos RVFV, CCHF e SFS) ou um imunógeno do coronavírus (por exemplo, uma proteína ou peptídeo do coronavírus humano infeccioso, tais como a glicoproteína do envoltório do coronavírus humano ou uma proteína ou peptídeo do vírus da gastroenterite transmissível de porcino, ou uma proteína ou peptídeo do vírus da bronquite infecciosa aviária). A proteína ou polipeptídeo codificado pelo

ácido nucleico heterólogo desta invenção pode ainda ser um antígeno de pólio, antígeno de herpes (por exemplo, antígenos CMB, EBV, HSV), antígeno de cachumba, antígeno do sarampo, antígeno da rubéola, antígeno da varicela, toxina botulínica, toxina da difteria e outro antígeno da difteria, antígeno da coqueluche, antígeno da hepatite (por exemplo, Hepatite A, Hepatite B, Hepatite C, Hepatite D ou Hepatite E) ou qualquer outro antígeno de vacina conhecido na técnica.

[041] Como aqui usado, “eliciar uma resposta imune” e “imunizar um indivíduo” inclui o desenvolvimento, em um indivíduo, de uma resposta imune humoral e/ou celular a uma proteína e/ou polipeptídeo desta invenção (por exemplo, um imunógeno, um antígeno, um peptídeo imunogênico e/ou um ou mais epítomos). Uma resposta imune “humoral”, como este termo é bem conhecido na técnica, refere-se a uma resposta imune compreendendo anticorpos, enquanto uma resposta imune “celular”, como este termo é bem conhecido na técnica, refere-se a uma resposta imune, compreendendo linfócitos-T e outras células sangüíneas brancas, especialmente a resposta específica de imunógeno por células-T citolíticas restringidas-HLA, isto é, “CTLs”. Uma resposta imune celular ocorre quando os imunógenos processados, isto é, fragmentos de peptídeo, são exibidos em conjunto com as proteínas HLA do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), que são de dois tipos gerais, classe I e classe II. As CTLs restringidas-HLA Classe I geralmente ligam-se aos peptídeos 9-mer e apresentam aqueles peptídeos na superfície da célula. Estes fragmentos de peptídeo, no contexto da molécula Classe I HLA, são reconhecidos pelas proteínas de Receptor de Célula-T (TCR) nos linfócitos-T, resultando na ativação da célula T. A ativação pode resultar em numerosos resultados funcionais, incluindo mas não limitado a expansão do subconjunto de células-T específicas, resultando em destruição da célula contendo o complexo de peptídeo-HLA diretamente através de eventos citotóxicos ou apoptóticos ou

na ativação de mecanismos não-destrutivos, por exemplo, a produção de interferon/citocinas. A apresentação de imunógenos, via proteínas MHC Classe I, tipicamente estimula uma resposta CD8+CTL.

[042] Outro aspecto da resposta imune celular envolve as respostas de célula-T restringidas-Classe II HLA, envolvendo a ativação das células-T auxiliares, que estimulam e põem em evidência a atividade das células efetadoras não específicas, exibindo os fragmentos de peptídeo em associação com as moléculas MHC em sua superfície. Pelo menos dois tipos de células auxiliares são reconhecidos: Células auxiliares-T 1 (Th1), que secretam as citocinas interleucina 2 (IL-2) e interferon gama e células auxiliares T 2 (Th2), que secretam as citocinas interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10). A apresentação de imunógenos via proteínas MHC Classe II tipicamente elicia uma resposta CTL CD4+, bem como a estimulação dos linfócitos B, o que resulta em uma resposta anticorpo.

[043] Um “polipeptídeo imunogênico”, “peptídeo imunogênico” ou “imunógeno”, como aqui usado, inclui qualquer peptídeo, proteína ou polipeptídeo que elicie uma resposta imune em um indivíduo e em certas formas de realização, o polipeptídeo imunogênico sendo adequado para prover algum grau de proteção a um indivíduo contra uma doença. Estes termos podem ser usados intercambiavelmente com o termo “antígeno”.

[044] Em certas formas de realização, o imunógeno desta invenção pode compreender, consistir essencialmente de ou consistir de um ou mais “epítomos”. Um “epítopo” é um conjunto de resíduos amino ácidos, que é envolvido no reconhecimento por uma imunoglobulina particular. No contexto das células T, um epítopo é definido como o conjunto de resíduos amino ácidos necessários para reconhecimento pelas proteínas de receptor de célula T e/ou receptores MHC. Em um cenário de sistema imune, *in vivo* ou *in vitro*, um epítopo refere-se aos aspectos coletivos de uma molécula, tais como

estrutura e/ou carga de peptídeo primária, secundária e/ou terciária, que, juntas, formam um sítio reconhecido por uma imunoglobulina, receptor de célula T e/ou molécula HLA. No caso de um epítipo de célula-B (anticorpo), é tipicamente um mínimo de 3-4 amino ácidos, preferivelmente pelo menos 5, variando até aproximadamente 50 amino ácidos. Preferivelmente, os epítipos indutores de resposta humoral estão entre 5 e 30 amino ácidos, usualmente entre 12 e 25 amino ácidos e muitíssimo comumente entre 15 e 20 amino ácidos. No caso de um epítipo de célula-T, um epítipo inclui pelo menos cerca de 7 – 9 amino ácidos e, para um epítipo de célula-T auxiliar, pelo menos cerca de 12 – 20 amino ácidos. Tipicamente, tal epítipo de célula-T incluirá entre cerca de 7 a 15 amino ácidos, por exemplo, 7, 8, 9, 10,11, 12, 13, 14 ou 15 amino ácidos.

[045] A presente invenção pode ser empregada para expressar um ácido nucleico codificando um polipeptídeo imunogênico em um indivíduo (por exemplo, para vacinação) ou para imunoterapia (por exemplo, para tratar um indivíduo com câncer ou tumores). Assim, no caso de vacinas, a presente invenção provê, desse modo, métodos de eliciar uma resposta imune em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade imunogênica de um ácido nucleico, partícula, população e/ou composição desta invenção.

[046] É também contemplado que os ácidos nucleicos, partículas, populações e composições farmacêuticas desta invenção possam ser empregadas em métodos de suprimento de um NOI de interesse a uma célula, que pode ser uma célula de um indivíduo. Assim, a presente invenção provê um método de suprir um ácido nucleico heterólogo a uma célula, compreendendo introduzir dentro da célula uma quantidade eficaz de um ácido nucleico, partícula, população e/ou composição desta invenção. É também provido um método de suprir um ácido nucleico heterólogo a uma célula de um indivíduo, compreendendo suprir ao indivíduo uma quantidade

eficaz de um ácido nucleico, partícula, população e/ou composição desta invenção. Tais métodos podem ser empregados para conceder um efeito terapêutico em uma célula e/ou indivíduo desta invenção, de acordo com protocolos bem conhecidos para terapia genética.

[047] Um “indivíduo” desta invenção inclui mas não é limitado a animais de sangue quente, por exemplo, humanos, primatas não-humanos, cavalos, vacas, gatos, cães, porcos, ratos e camundongos. A administração das várias composições desta invenção (por exemplo, ácidos nucleicos, partículas, populações e/ou composições) pode ser realizada por qualquer uma das diversas diferentes rotas. Em formas de realização específicas, as composições podem ser administradas intramuscular, subcutânea, intraperitoneal, intradérmica, intranasal, intracraniana, sublingual, intravaginal, intrarretal, oral ou topicamente. As composições aqui podem ser administradas via um método de escarificação de pele ou transdermicamente via um emplastro ou líquido. As composições podem ser supridas subdermicamente, na forma de um material biodegradável que libere as composições durante um período de tempo.

[048] As composições desta invenção podem ser usadas profilaticamente para evitar doença ou terapêuticamente tratar doença. Doenças que podem ser tratadas incluem doença infecciosa, causada por vírus, bactérias, fungos ou parasitas, e câncer. Doenças crônicas, envolvendo a expressão de proteínas aberrantes ou anormais ou a superexpressão de proteínas normais, podem também ser tratadas, por exemplo, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, acidente vascular cerebral etc.

[049] As composições desta invenção podem ser otimizadas e combinadas com outros regimes de vacinação, para prover as mais amplas (isto é, todos os aspectos da resposta imune, incluindo aqueles aspectos descritos acima) respostas celulares e humorais possíveis. Em certas formas de realização, isto pode incluir o uso de estratégias de reforço

principal heterólogas, em que as composições desta invenção são usadas em combinação com uma composição compreendendo um ou mais dos seguintes: imunógenos derivados de um patógeno ou tumor, imunógenos recombinantes, átomos de nitrogênio nus, ácidos nucleicos formulados com porções contendo lipídeo, vetores não-alfa-vírus (incluindo mas não limitado a vetores da varíola, vetores adenovirais, vetores do herpes, vetores do vírus da estomatite vesicular, vetores paramixovirais, vetores de parvovírus, vetores de papovavírus, vetores retrovirais) e outros vetores de alfa-vírus. Os vetores virais podem ser partículas semelhantes a vírus ou ácidos nucleicos. Os vetores alfa-vírus podem ser partículas contendo replicon, vetores contendo replicon baseado em DNA (às vezes referidos como um sistema “ELVIS”; vide, por exemplo, Patente U.S. No. 5.814.482) ou vetores de RNA nus.

[050] As composições da presente invenção podem também ser empregadas para produzir uma resposta imune contra agentes infecciosos crônicos ou latentes, que tipicamente persistem porque deixam de elicitar uma forte resposta imune no indivíduo. Agentes infecciosos latentes ou crônicos ilustrativos incluem mas não são limitados a hepatite B, hepatite C, Vírus Epstein-Barr, vírus do herpes, vírus da imunodeficiência humana e vírus do papiloma humano. Os vetores de alfa-vírus codificando peptídeos e/ou proteínas destes agentes infecciosos podem ser administrados a uma célula ou um indivíduo de acordo com os métodos aqui descritos.

[051] Alternativamente, a proteína ou peptídeo imunogênico pode ser qualquer antígeno de célula de tumor ou câncer. Preferivelmente, o antígeno de tumor ou câncer é expresso na superfície da célula de câncer. Antígenos de câncer exemplificativos, para cânceres específicos de mama, são os antígenos HER2 e BRCA1. Outros antígenos de célula de câncer e tumor ilustrativos são descritos em S.A. Rosenberg (1999), *Immunity* 10:281) e incluem mas não são limitados a antígenos MART-1/MelanA, gp100, tirosinase, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE-

1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, β -CATENINA, MUM-1, Caspase-8, KIAA0205, HPVE&, SART-1, PRAME, P15 E P53, antígeno de tumor de Wilms, tirosinase, antígeno carcinoembriônico (CEA), antígeno específico de próstata (PSA), antígeno de membrana específica de próstata (PSMA), antígeno de célula tronco de próstata (PSCA), β -hidroxilase da aspartila (asparaginila) humana (HAAH) e EphA2 (uma cinase de tirosina de célula epitelial, vide Publicação de Patente Internacional No. WO 01/12172).

[052] O polipeptídeo ou peptídeo imunogênico desta invenção pode também ser um antígeno de célula de câncer ou tumoral “universal” ou “artificial”, como descrito na Publicação de Patente Internacional No. WO 99/51263, que é incorporada aqui por referência em sua totalidade, para os ensinamentos de tais antígenos.

[053] Em varias formas de realização, o ácido nucleico heterólogo desta invenção pode codificar uma sequência de ácido nucleico anti-sentido. Um ácido nucleico “anti-sentido” é uma molécula de ácido nucleico (isto é, DNA ou RNA) que é complementar (isto é, capaz de hibridizar *in vivo* ou sob rigorosas condições *in vitro*) a todo ou uma parte de um ácido nucleico (por exemplo, um gene, um cDNA e/ou mRNA) que codifique ou esteja envolvido na expressão do ácido nucleico que codifica um polipeptídeo a ser alvejado para produção inibida ou reduzida, pela ação do ácido nucleico anti-sentido. Se desejado, métodos convencionais podem ser usados para produzir um ácido nucleico anti-sentido, que contém modificações desejáveis. Por exemplo, um oligonucleotídeo de fosforotioato pode ser usado como o ácido nucleico anti-sentido, para inibir a degradação do oligonucleotídeo anti-sentido por nucleases *in vivo*. Onde o ácido nucleico anti-sentido for complementar a uma parte do ácido nucleico codificando o polipeptídeo a ser alvejado, o ácido nucleico anti-sentido deve hibridizar bastante próximo da extremidade 5' do ácido nucleico codificando o polipeptídeo, de modo que iniba a tradução de um polipeptídeo funcional.

Tipicamente, isto significa que o ácido nucleico anti-sentido deve ser complementar a uma sequência que situe-se dentro da metade ou terça parte de 5' do ácido nucleico a que ele hibridiza.

[054] Um ácido nucleico anti-sentido desta invenção pode também codificar um RNA catalítico (isto é, uma ribozima) que iniba a expressão de um ácido nucleico alvo em uma célula, hidrolisando um mRNA codificando o produto genético alvejado. Adicionalmente, o RNA cabeça de martelo pode ser usado como um ácido nucleico anti-sentido, para evitar a divisão do intron. Um ácido nucleico anti-sentido desta invenção pode ser produzido e testado de acordo com protocolos de rotina na técnica para tecnologia anti-sentido.

[055] O termo “alfa-vírus”, como aqui usado, tem seu significado convencional na técnica e inclui vírus de Encefalite de Equinos (EEE) do Leste, vírus de Encefalite de Equinos da Venezuela (VEE), vírus Everglades, vírus Mucambo, vírus Puxun, vírus da Encefalite Ocidental (WEE), vírus Sindibis, Arbovírus da África do Sul No. 86 (S.A.AR86), vírus Girdwood S.A., vírus Ockelbo, vírus Semliki Forest, vírus Middleburg, vírus Chikungunya, vírus O’Nyong-Nyong, vírus Ross River, vírus Barmah Forest, vírus Getah, vírus Sagiyama, vírus Bebaru, vírus Mayaro, vírus Uma, vírus Aura, vírus Whataroa, vírus Babanki, vírus Kyzlagach, vírus Highlands J, vírus Fort Morgan, vírus Ndumu, vírus Buggy Creek e quaisquer outros vírus classificados pelo International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) como um alfa-vírus.

[056] Em formas de realização específicas desta invenção, os ácidos nucleicos e/ou as proteínas codificadas pelos ácidos nucleicos da presente invenção podem compreender mutações atenuantes. As frases “mutação atenuante” e “amino ácido atenuante”, como aqui usadas, incluem uma sequência de nucleotídeo contendo uma mutação ou um amino ácido codificado por uma sequência de nucleotídeo contendo uma mutação, que

resulte em uma probabilidade diminuída de causar doença em seu hospedeiro (isto é, redução ou “atenuação” da virulência), de acordo com a terminologia padrão da técnica. Vide, por exemplo, Davis e outros, MICROBIOLOGY 132 (3^a. ed. 1980). A frase “mutação atenuante” exclui mutações ou combinações de mutações que seriam letais aos vírus. Entretanto, ela realmente inclui aquelas mutações de outro modo letais, que possam ser incorporadas em combinação com uma mutação ressuscitante ou resgatante, que resulte em um fenótipo atenuado.

[057] As mutações atenuantes apropriadas serão dependentes do alfa-vírus usado e serão conhecidas daqueles hábeis na técnica. Mutações atenuantes exemplificativas incluem mas não são limitadas àquelas descritas na Patente U.S. No. 5.505.947 de Johnston e outros, Patente U.S. No. 5.185.440 de Johnston e outros, Patente U.S. No. 5.643.576 de Davis e outros, Patente U.S. No. 5.792.462 de Johnston e outros e Patente U.S. No. 5.639.650 de Johnston e outros, cujas descrições são incorporadas aqui por referência em suas totalidades, por referência.

[058] Nas várias formas de realização desta invenção, uma ou mais das proteínas estruturais de alfa-vírus das partículas de alfa-vírus desta invenção pode(m) compreender uma ou mais mutação(ões) atenuante(s), por exemplo, como definido nas Patentes U.S. Nos. 5.792.462 e 6.156.558. Mutações atenuantes específicas para a glicoproteína VEE E1 podem incluir uma mutação atenuante em qualquer uma das posições amino ácidas E1 81, 272 e/ou 253. Partículas de alfa-vírus produzidas do mutante VEE-3042 contêm uma substituição de isoleucina em E1-81 e as partículas de vírus produzidas do mutante VEE-3040 contêm uma mutação atenuante em E1-253. Mutações atenuantes específicas para a glicoproteína VEE E2 podem incluir uma mutação atenuante em qualquer uma das posições amino ácidas E2 76, 120 ou 209. As partículas de alfa-vírus, produzidas do mutante VEE-3014, contêm mutações atenuantes tanto em E1-272 como em E2-209 (vide

Patente U.S. No. 5.792.492). Uma mutação atenuante específica para a glicoproteína VEE E3 inclui uma mutação atenuante, consistindo de uma deleção de amino ácidos E3 56-59. As partículas de vírus, produzidas do mutante VEE-3526, contêm esta deleção em E3 (aa56-59), bem como uma segunda mutação atenuante em E1-253. Mutações atenuantes específicas para a glicoproteína E2 S.A.AR86 incluem uma mutação atenuante em qualquer uma das posições amino ácidas E2 304, 314, 372 ou 376. Alternativamente, a mutação atenuante pode ser uma substituição, deleção e/ou inserção de um amino ácido na glicoproteína E2, por exemplo, em qualquer uma ou mais das seguintes posições amino ácidas em qualquer combinação: 158, 159, 160, 161 e 162 (vide Polo e outros, Publicação PCT WO 00/61772, cujo inteiro conteúdo é incorporado aqui por referência).

[059] Outra mutação atenuante desta invenção pode ser uma mutação atenuante no nucleotídeo 3 do RNA genômico VEE, isto é, o terceiro nucleotídeo em seguida a cap metilado 5' (vide, por exemplo, Patente U.S. No. 5.643.576, descrevendo uma mutação G → C em nt 3). A mutação pode ser uma mutação G → A, U ou C, mas pode também ser uma mutação G → A em algumas formas de realização.

[060] Quando as proteínas estruturais de alfa-vírus e/ou não-estruturais são de S.A.AR86, mutações atenuantes exemplificativas das proteínas estruturais e não-estruturais incluem mas não são limitadas a códons na posição amino ácida de nsp1 538, que especificam um amino ácido atenuante, preferivelmente isoleucina, como amino ácido nsp1 538; os códons da posição amino ácida E2 304, que especificam um amino ácido atenuante, preferivelmente treonina, como amino ácido E2 304; códons na posição de amino ácido E2 314, que especificam um amino ácido atenuante, preferivelmente lisina, como amino ácido E2 314; códons no amino ácido E2 372, que especificam um amino ácido atenuante, preferivelmente leucina, no resíduo amino ácido E2 372; os códons na posição amino ácida E2 376, que

especificam um amino ácido atenuante, preferivelmente alanina, como amino ácido E2 376; em combinação, os códons dos resíduos de amino ácido E2 304, 314, 372 e 376, que especificam amino ácidos atenuantes, como descrito acima; códons na posição de amino ácido nsp2 96, que especificam um amino ácido atenuante, preferivelmente glicina, como amino ácido nsp2 96; e códons na posição amino ácida nsp2 372, que especificam um amino ácido atenuante, preferivelmente valina, como amino ácido nsp2 372; em combinação, os códons dos resíduos amino ácidos nsp2 96 e 372, que codificam amino ácidos atenuantes nos resíduos amino ácidos nsp2 96 e 372, como descrito acima; códons no resíduo amino ácido nsp2 529, que especificam um amino ácido atenuante, preferivelmente leucina, no resíduo amino ácido nsp2 529; códons no resíduo amino ácido nsp2 571, que especificam um amino ácido atenuante, preferivelmente asparagina, no resíduo amino ácido nsp2 571; códons no resíduo amino ácido nsp2 682, que especificam um amino ácido atenuante, preferivelmente arginina, no resíduo amino ácido nsp2 682; códons no resíduo amino ácido nsp2 804, que especificam um amino ácido atenuante, preferivelmente arginina, no resíduo amino ácido nsp2 804; códons no resíduo amino ácido nsp3 22, que especificam um amino ácido atenuante, preferivelmente arginina, no resíduo amino ácido nsp3 22; e em combinação, códons nos resíduo amino ácido nsp2 529, 572, 682 e 804 e no resíduo amino ácido nsp3 22, que especificam amino ácidos atenuantes, como descrito acima.

[061] Outras mutações atenuantes ilustrativas incluem aquelas descritas no Pedido PCT No. PCT/US01/27644 (cuja descrição é incorporada aqui por referência em sua totalidade por referência). por exemplo, a mutação atenuante pode ser uma mutação atenuante da posição amino ácida 537 da proteína nsp3 S.A.AR86, mais preferivelmente uma mutação de substituição nesta posição, ainda mais preferivelmente uma mutação sem sentido, que resulta em substituição de um códon de terminação.

Os códons de terminação translacional (isto é, parada) são conhecidos na técnica e incluem os códons de terminação “opala” (UGA), “âmbar” (UAG) e “ocre” (UAA). Nas formas de realização da presente invenção, a mutação atenuante pode resultar em uma substituição Cys → opala na posição aminoácida nsp3 S.A.AR86 537.

[062] Outras mutações atenuantes exemplificativas podem incluir uma mutação de inserção atenuante em seguida a aminoácido 385 da proteína nsp3 S.A.AR86. A inserção pode compreender uma inserção de pelo menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ou 20 aminoácidos. Em algumas formas de realização da invenção, a sequência aminoácida inserida é rica em resíduos de serina e treonina (por exemplo, compreende pelo menos 2, 4, 6 ou 8 de tais sítios), que servem como um substrato para fosforilação por cinases de serina/treonina.

[063] Em certas formas de realização, a mutação atenuante pode compreender inserção da sequência aminoácida Ile-Thr-Ser-Met-Asp-Ser-Trp-Ser-Ser-Gly-Pro-Ser-Ser-Leu-Glu-Ile-Val-Asp (SEQ ID NO: 1) em seguida ao aminoácido 385 de nsp3 (isto é, o primeiro aminoácido é designado como aminoácido 386 de nsp3). Em outras formas de realização da invenção, a mutação de inserção pode compreender a inserção de um fragmento de SEQ ID NO: 1, que resulta em um fenótipo atenuado. O fragmento pode compreender pelo menos 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16 ou 17 aminoácidos contíguos da SEQ ID NO: 1.

[064] Aqueles hábeis na técnica apreciarão que outras sequências de inserção atenuantes, compreendendo um fragmento da sequência exposta acima, ou que incorpore substituições aminoácidas conservativas dentro da sequência exposta acima, podem ser rotineiramente identificadas por métodos de rotina (como descrito acima). Embora não desejando ficarmos presos por qualquer teoria da invenção, parece que a sequência de inserção da SEQ ID NO:1 é altamente fosforilada nos resíduos

de serina, o que confere um fenótipo atenuado. Assim, outras sequências de inserção atenuantes, que servem como substratos para fosforilação de serina (ou treonina), podem ser identificadas por técnicas convencionais conhecidas na técnica. Alternativa ou adicionalmente, há uma substituição Tyr → Ser no amino ácido 385 da proteína nsp3 S.A.AR86 (isto é, logo antes da sequência de inserção acima). Esta sequência é conservada nos vírus de grupo Sindbis-não-virulento, porém é deletada de S.A.AR86.

[065] Em outras formas de realização, o alfa-vírus desta invenção pode ser qualquer cepa de vírus Sindbis (por exemplo, TR339), VEE (tendo uma mutação no nucleotídeo 3 do RNA genômico, em seguida a cap metilado), vírus S.A.AR86, vírus Girdwood S.A., vírus Ockelbo e ou seus vírus quiméricos. As sequências genômicas completas, bem como as sequências das várias proteínas estruturais e não estruturais, são conhecidas na técnica para numerosos alfa-vírus e incluem: sequência genômica do vírus Sindbis (Acesso GenBank No. J02363, Acesso NCBI No. NC-001547), sequência genômica S.A.AR86 (Acesso GenBank No. U38305), sequência genômica VEE (acesso GenBank no. L04653, Acesso NCBI No. NC_001449), sequência genômica Girdwood S.A. (acesso GenBank No. U38304), sequência genômica do vírus Semliki Forest (acesso GenBank No. X04129, Acesso NCBI No. NC_003215) e a sequência genômica TR339 (Klimstra e outros (1988) J. Virol. 72:7357; McKnight e outros (1996) J. Virol. 70:1981).

[066] Em formas de realização particulares da presente invenção, a proteína estrutural de alfa-vírus desta invenção pode ser uma proteína estrutural do vírus Sindbis, uma proteína estrutural SFV, uma proteína estrutural VEE, uma proteína estrutural do vírus Ross River, uma proteína estrutural S.A. AR86, uma proteína estrutural EEE e/ou uma proteína estrutural WEE. Estas podem estar presentes em qualquer combinação entre si e podem estar presentes em combinação com quaisquer proteínas não

estruturais de alfa-vírus e/ou outras sequências alfavirais, tais como a sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5', o promotor subgenômico de alfa-vírus e a sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3', de qualquer uma destes e/ou outros alfa-vírus, para produzir partículas de alfa-vírus recombinantes quiméricos e/ou ácidos nucleicos recombinantes quiméricos desta invenção.

[067] Em outras formas de realização, o elemento IRES desta invenção dirige a tradução do produto genético codificado pelo ácido nucleico heterólogo do ácido nucleico recombinante desta invenção, de modo que pelo menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% da tradução do produto genético, codificado pelo ácido nucleico heterólogo, são controlados pela atividade do elemento IRES. A percentagem de tradução do produto genético codificado pelo ácido nucleico heterólogo dos ácidos nucleicos de replicon recombinantes desta invenção, quando controlado pelo IRES, pode ser determinada de acordo com ensaios bem conhecidos na técnica e como descrito na seção de Exemplos provida aqui.

[068] Além disso, nas formas de realização desta invenção, em que o elemento IRES desta invenção dirige a tradução de uma proteína estrutural de alfa-vírus presente em uma construção auxiliar desta invenção, o elemento IRES desta invenção pode dirigir a tradução da(s) proteína(s) estrutural(ais), de modo que pelo menos 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% da tradução da proteína estrutural são controlados pela atividade do elemento IRES. A percentagem de tradução da(s) proteína(s) estrutural(ais), como controlado pelo elemento IRES desta invenção, pode ser determinada de acordo com ensaios bem conhecidos na técnica e como descrito na seção Exemplos aqui provida.

[069] O ácido nucleico desta invenção pode ser RNA ou DNA.

[070] Em outra forma de realização desta invenção, uma série de ácidos nucleicos auxiliares (“construções auxiliares” ou “moléculas auxiliares”), isto é moléculas de DNA ou RNA recombinante, que expressam uma ou mais proteínas estruturais de alfa-vírus, são providas. Em um conjunto de formas de realização de RNA, a construção auxiliar compreende uma primeira sequência de ácido nucleico codificando (i) uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5’, (ii) um promotor transcricional, (iii) uma sequência de ácido nucleico codificando pelo menos uma das, porém não todas, proteínas estruturais de alfa-vírus e (iv) uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3’. Em certas formas de realização, as glicoproteínas E1 e E2 são codificadas por uma construção auxiliar e a proteína de capsídeo é codificada por outra construção auxiliar separada. Em outra forma de realização, cada uma das glicoproteína E1, glicoproteína E2 e proteína de capsídeo é codificada por construções auxiliares separadas. Em outras formas de realização, a proteína de capsídeo e uma das glicoproteínas são codificadas por uma construção auxiliar e a outra glicoproteína é codificada por uma segunda construção auxiliar separada. Em ainda outras formas de realização, a proteína de capsídeo e glicoproteína E2 são codificadas por uma construção auxiliar separada. Em certas formas de realização, as construções auxiliares desta invenção não incluem um sinal de acondicionamento de alfa-vírus.

[071] Alternativamente, os ácidos nucleicos auxiliares acima descritos são construídos como moléculas de DNA, que podem ser estavelmente integradas dentro do genoma de uma célula auxiliar ou expressas por um epissoma (por exemplo, epissoma derivado EBV). A molécula de DNA pode também ser provisoriamente expressa em uma célula. A molécula de DNA pode ser qualquer vetor conhecido na técnica, incluindo

mas não limitado a um vetor de DNA não-integrante, tal como um plasmídeo ou um vetor viral. A molécula de DNA pode codificar uma ou todas as proteínas estruturais de alfa-vírus, em qualquer combinação, como aqui descrito.

[072] As construções auxiliares desta invenção são introduzidas dentro das “células auxiliares”, que são usadas para produzir as partículas de alfa-vírus desta invenção. Como dito acima, os ácidos nucleicos codificando as proteínas estruturais de alfa-vírus, podem estar presentes na célula auxiliar provisoriamente ou por integração estável dentro do genoma da célula auxiliar. O ácido nucleico codificando as proteínas estruturais de alfa-vírus, que são usadas para produzir partículas de alfa-vírus desta invenção, podem estar sob o controle de promotores constitutivos e/ou indutíveis. Como também citado acima, as sequências codificando a proteína estrutural de alfa-vírus podem ser providas em um ácido nucleico de replicon recombinante e/ou uma construção auxiliar compreendendo um elemento IRES e a tradução destas sequências codificantes pode ser controlada pela atividade de um elemento IRES. Em tais formas de realização, o elemento IRES pode ser ativo no tipo de célula auxiliar específica e não ativo, ou minimamente ativo, em outros tipos de células. Em formas de realização particulares, as células auxiliares da invenção compreendem sequências de ácido nucleico codificando as proteínas estruturais de alfa-vírus em uma combinação e/ou quantidade suficiente para produzir uma partícula de alfa-vírus desta invenção, quando um ácido nucleico de replicon recombinante é introduzido dentro da célula sob condições pelas quais as proteínas estruturais de alfa-vírus são produzidas e o ácido nucleico de replicon recombinante é acondicionado dentro da partícula de alfa-vírus desta invenção.

[073] Em todas as formas de realização desta invenção, é contemplado que pelo menos uma das proteínas estruturais e/ou não-estruturais de alfa-vírus, codificadas pelo ácido nucleico de replicon

recombinante e/ou moléculas auxiliares e/ou regiões não-transladadas do ácido nucleico de replicon recombinante e/ou auxiliar, pode conter uma ou mais mutações em qualquer combinação, como aqui descrito e como é bem conhecido na literatura.

[074] Em construções particulares desta invenção, um promotor para dirigir a transcrição de RNA de DNA, isto é, uma polimerase de DNA dependente de DNA, é empregado. Nas formas de realização de RNA auxiliar e replicon desta invenção, o promotor é utilizado para sintetizar o RNA em uma reação de transcrição *in vivo* e promotores específicos, adequados para este uso, incluem mas não são limitados aos promotores de polimerase de RNA SP6, T7 e T3. Nas formas de realização de auxiliar de DNA, o promotor funciona dentro de uma célula para dirigir a transcrição do RNA. Promotores potenciais para transcrição *in vivo* da construção incluem mas não são limitados a promotores eucarióticos, tais como promotores da polimerase II de RNA, promotores de polimerase III de RNA ou promotores virais tais como MMTV e MoSV LTR, região inicial SV40, RSV ou CMV. Muitos outros promotores de mamíferos e virais adequados para a presente invenção são disponíveis e são conhecidos da técnica. Alternativamente, os promotores de polimerase de RNA dependentes de DNA das bactérias ou bacteriófago, por exemplo, SP6, T7 e T3 podem ser empregados para uso *in vivo*, com a polimerase de RNA de união sendo provida na célula, via um plasmídeo, vetor de RNA ou vetor viral separado. Em uma forma de realização específica, a polimerase de RNA de união pode ser estavelmente transformada em uma linhagem de célula auxiliar, sob o controle de um promotor indutível. Construções que funcionam dentro de uma célula podem funcionar como plasmídeos autônomos, transfectados dentro da célula e/ou podem ser estavelmente transformados no genoma. Em uma linhagem de célula estavelmente transformada, o promotor pode ser um promotor indutível, de modo que a célula somente produzirá a polimerase de RNA

codificada pela construção estavelmente transformada quando a célula for exposta ao apropriado estímulo (indutor). As construções auxiliares são introduzidas dentro da célula estavelmente transformada, concomitantemente com a, antes da e/ou após a exposição ao indutor, desse modo realizando a expressão das proteínas estruturais de alfa-vírus. Alternativamente, as construções projetadas para funcionar dentro de uma célula podem ser introduzidas dentro da célula via um vetor viral, tal como, por exemplo, adenovírus, poxvírus, vírus adeno-associado, SV40, retrovírus, nodavírus, picornavírus, vírus da estomatite vesicular e baculovírus com promotores pol II mamíferos.

[075] Em certas formas de realização da invenção aqui providas, o ácido nucleico de replicon recombinante e/ou ácido nucleico auxiliar desta invenção podem compreender um ácido nucleico espaçador, que pode ser localizado a montante de um elemento IRES de um ácido nucleico de replicon recombinante e/ou ácido nucleico auxiliar desta invenção. O ácido nucleico espaçador pode compreender, consistir essencialmente de ou consistir de qualquer sequência de ácido nucleico não-codificante aleatória ou específica, que seja de um comprimento suficiente para evitar pelo menos, e em algumas formas de realização, toda tradução de cap 5' de um RNA mensageiro, de modo que a tradução seja então dirigida pelo IRES, em parte ou no todo. Alternativamente, o ácido nucleico espaçador pode ser de um comprimento e estrutura de sequência que concedam suficiente estrutura secundária ao ácido nucleico, para evitar pelo menos alguma e possivelmente toda atividade de tradução de cap 5' de um RNA mensageiro.

[076] Como exemplo, um plasmídeo comercialmente disponível, pCDNA 3.1(-), foi digerido com uma enzima de restrição, AluI, que corta freqüentemente dentro deste plasmídeo, assim gerando muitos fragmentos aleatória e diferentemente dimensionados (vide Exemplo 3 para

detalhes). O plasmídeo pCDNA têm o comprimento de 5427 nucleotídeos e é um vetor de expressão eucariótico, compreendendo vários promotores (CMV, T7, SV40) para expressão de um ácido nucleico inserido, bem como sinais de poliadenilação e genes de resistência a antibióticos. A enzima AluI corta através destes elementos, provendo uma faixa de fragmentos aleatórios. Exemplos de diversos diferentes espaçadores e suas sequências, que foram geradas por este exemplo e que não codificam quaisquer elementos funcionais do plasmídeo, são fornecidos abaixo:

espaçador de 357 nucleotídeos

CTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGC
AATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAG
CTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACC
AAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTC
TGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGC
TGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGT
TACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACA
GCCAG

espaçador de 342 nucleotídeos

CTATCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAA
AAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCG
TTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGG
GTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTC
TGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGT
CAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGC
GGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAG

espaçador de 257 nucleotídeos

CTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAA
AGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTC
CACTATTAAGAAGCTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTAT
CAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGG
GTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGAT
TTAGAG

espaçador de 383 nucleotídeos

CTGCGCAAGGAACGCCCGTTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCG
TCCTGCAGTTCATTCAGGGCACCGGACAGGTCGGTCTTGACAAAAAGAAC
CGGGCGCCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCG
ATTGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAGCGGCC
GGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCAATCATGCGAAACGATCCTCAT
CCTGTCTCTTGATCAGATCCGAAAATGGATATACAAGCTCACTCATTAGGC
ACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGT
GAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAG

espaçador de 579 nucleotídeos

CTGCAATAAACAAGTTGGGGTGGGCGAAGAAGTCCAGCATGAGATCCCCG
 CGCTGGAGGATCATCCAGCCGGCGTCCCGGAAAACGATTCCGAAGCCCAA
 CCTTTCATAGAAGGCGGGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGG
 GCGTCGCTTGGTCGGTCATTTTCGAACCCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACT
 CGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGAT
 ACCGTAAGCACGAGGAAGCGGTTCAGCCATTCGCCGCCAAGCTTGTATA
 TCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATT
 GAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCT
 ATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCG
 TGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACC
 TGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGG
 CTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAG

espaçador de 749 nucleotídeos

CTGCAATAAACAAGTTGGGGTGGGCGAAGAAGTCCAGCATGAGATCCCCG
 CGCTGGAGGATCATCCAGCCGGCGTCCCGGAAAACGATTCCGAAGCCCAA
 CCTTTCATAGAAGGCGGGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGG
 GCGTCGCTTGGTCGGTCATTTTCGAACCCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACT
 CGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGAT
 ACCGTAAGCACGAGGAAGCGGTTCAGCCATTCGCCGCCAAGCTTTCAG
 CAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTGATAGCGGTCCGCCACACCC
 AGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGAT
 ATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTTCACGACGAGATCCTCGCCGTCGG
 GCATGCGCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCCTGA
 TGCTCTTCGTCCAGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATCCGAGTA
 CGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTTCGAATGGGCAGGTAGCC
 GGATCAAGCGTATGCAGCCGCCGCATTGCATCAGCCATGATGGATACTTT
 CTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCCGGCACTTCGC
 CCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAG

[077] Além do uso de fragmentos de ácido nucleico aleatórios, gerados de um plasmídeo não relacionado (como nos fragmentos AluI descritos acima), é também possível utilizarem-se fragmentos de genes celulares ou virais, por exemplo, das regiões não codificantes 5' de genes, como espaçadores. Um caminho é utilizarem-se as sequências não-codificantes circundando um IRES existente (vide Exemplo 4B.4.); outro caminho é utilizar-se a região 5' não-codificante de um gene alfaviral, por exemplo, o gene capsídeo (vide Exemplo 4A.2.)

[078] Assim, é contemplado que o ácido nucleico espaçador desta invenção possa ser, no mínimo, de pelo menos 25 ácidos nucleicos de comprimento e possa ser tão comprido quanto permissível em um dado ácido nucleico de replicon recombinante. Por exemplo, o ácido nucleico espaçador desta invenção pode ter, em certas formas de realização, o

comprimento de aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75,80, 85, 90, 95, 100, 110,115, 120,125, 130, 135, 140, 145, 150,160, 170, 175, 180, 190, 200, 210, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 50, 475, 50, 600,700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500 ou 10000 nucleotídeos. Por “aproximadamente” pretendemos significar que o ácido nucleico espaçador pode variar até 10%, 15%, 20% e/ou 25% de comprimento.

[079] O ácido nucleico espaçador desta invenção pode também ser uma sequência de nucleotídeos colocada 3' até uma sequência 5'', para iniciar a transcrição de um RNA mensageiro, e 5' até um elemento IRES funcional, em que o nível de tradução dirigida de dito elemento IRES é de pelo menos aproximadamente cinco vezes mais elevado do que o nível obtido de um elemento IRES não funcional. Nas formas de realização preferidas, o nível de tradução é de pelo menos aproximadamente 10 vezes, 20 vezes, 50 vezes, 100 vezes, 150 vezes, 180 vezes, 200 vezes, 300 vezes, 400 vezes ou 500 vezes mais elevado. Em outras formas de realização, pelo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou 100% da tradução do produto genético, codificado pelo ácido nucleico heterólogo e/ou as proteína(s) estrutural(ais) codificadas por uma construção auxiliar contendo IRES, são controlados pela atividade do elemento IRES.

[080] A presente invenção também provê uma partícula alfa-vírus, compreendendo um ácido nucleico de replicon recombinante desta invenção. É também provida uma população de partículas de alfa-vírus infecciosas e defeituosas, em que cada partícula contém um RNA de replicon de alfa-vírus compreendendo o ácido nucleico de replicon recombinante desta invenção. Em algumas formas de realização, a população desta invenção não tem vírus competente-de-replicação detectável, conforme medido por

passagem em cultura de célula e/ou outros ensaios bem conhecidos, para detecção de vírus competente de replicação.

[081] A presente invenção provê ainda uma composição farmacêutica compreendendo um ácido nucleico, vetor, partícula e/ou população desta invenção em um veículo farmacêuticamente aceitável. Por “farmacêuticamente aceitável” pretendemos significar um material que não é biologicamente ou de outro modo indesejável, isto é, o material pode ser administrado a um indivíduo juntamente com o peptídeo, polipeptídeo, ácido nucleico, vetor ou célula selecionado, sem causar substanciais efeitos biológicos deletérios ou interagir de uma maneira deletéria com qualquer um dos outros componentes da composição em que é contido.

[082] Além disso, quaisquer das composições desta invenção pode compreender um veículo farmacêuticamente aceitável e um adjuvante adequado. Como aqui usado, “adjuvante adequado” descreve um adjuvante capaz de ser combinado com o peptídeo ou polipeptídeo desta invenção, para aumentar mais uma resposta imune, sem efeito deletério sobre o indivíduo ou a célula do indivíduo. Um adjuvante adequado pode ser mas não é limitado a MONTANIDE ISA51 (Seppic, Inc., Fairfield, NJ), formulação adjuvante SYNTEX 1 (SAF-1), composto de 5 por cento (peso/vol.) de esqualeno (DASF, Parsippany, N.J.), 2,5 por cento de polímero L121, Pluronic (Aldrich Chemical, Milwaukee) e 0,2 por cento de polissorbato (Tween 80, Sigma) em solução salina tamponada com fosfato. Outros adjuvantes adequados são bem conhecidos na técnica e incluem QS-21, adjuvante de Freund (completo e incompleto), sais de alumínio (alume), fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, referido como nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-idroxifosforilóxi)-etilamina (CGP 19835A, referida como MTP-PE) e RIBI, que contém três componentes

extraídos de bactérias, monofosforil lipídeo A, dimicolato de trealose e esqueleto de parede celular (MPL+TDM+CWS) em 2% esqualeno/emulsão Tween 80. Os adjuvantes podem ser combinados com as composições desta invenção ou com outras composições de vacina, que podem ser usadas em combinação com as composições desta invenção. Exemplos de adjuvantes podem também incluir mas não são limitados a formulações de emulsão de óleo-em-água, agentes imunoestimulantes, tais como componentes de parede celular bacteriana ou moléculas sintéticas, ou oligonucleotídeos (por exemplo, CpGs) e polímeros de ácido nucleico (RNA e DNA tanto de duplo filamento como de filamento único), que podem incorporar porções alternativas de cadeia principal, por exemplo, polímeros de polivinila.

[083] As composições da presente invenção podem também incluir outros agentes medicinais, agentes farmacêuticos, veículos, diluentes, citocinas imunoestimulatórias etc. Métodos atuais de preparar tais formas de dosagem são conhecidos ou serão evidentes para aqueles hábeis na técnica. Dosagens preferidas para partículas de replicon de alfa-vírus, como contemplado por esta invenção, podem variar de 10^3 a 10^{10} partículas por dose. Para humanos, 10^6 , 10^7 ou 10^8 são doses preferidas. Um regime de dosagem pode ser uma ou mais doses horárias, diárias, semanais, mensais, anuais etc., como julgado necessário para conseguir-se o desejado efeito profilático e/ou terapêutico, a ser conseguido pela administração de uma composição desta invenção em um indivíduo. A eficácia de uma dosagem particular pode ser determinada de acordo com métodos bem conhecidos na técnica.

[084] A presente invenção provê ainda um método para produzir partículas de alfa-vírus infecciosas e defeituosas, compreendendo: a) introduzir dentro de uma célula o seguinte: (i) um ácido nucleico de replicon recombinante desta invenção e (ii) um ou mais ácidos nucleicos auxiliares, codificando proteínas estruturais de alfa-vírus, em que o um ou mais ácidos

nucleicos auxiliares produzem todas as proteínas estruturais de alfa-vírus e (b) produzir ditas partículas de alfa-vírus na célula. Em algumas formas de realização, o ácido nucleico de replicon recombinante pode compreender pelo menos um ácido nucleico heterólogo codificando uma proteína estrutural de alfa-vírus.

[085] Em outras formas de realização dos métodos desta invenção, o ácido nucleico auxiliar pode ser um ácido nucleico recombinante, compreendendo uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5', um promotor subgenômico de alfa-vírus, um ácido nucleico codificando uma proteína estrutural de alfa-vírus e uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3'.

[086] Em outras formas de realização, o ácido nucleico auxiliar pode ser um ácido nucleico recombinante (que pode ser DNA) compreendendo um promotor (por exemplo, um promotor CMV) e sequências de nucleotídeo codificando uma ou mais, incluindo todas, proteínas estruturais de alfa-vírus.

[087] O ácido nucleico auxiliar desta invenção pode compreender sequências de ácido nucleico codificando qualquer uma ou mais das proteínas estruturais de alfa-vírus (C, E1, E2) em qualquer ordem e/ou em qualquer combinação. Assim, uma célula auxiliar pode compreender tantos ácidos nucleicos auxiliares quantos necessários, a fim de prover todas as proteínas estruturais de alfa-vírus, necessárias para produzir partículas de alfa-vírus. Uma célula auxiliar pode também compreender ácido(s) nucleico(s) auxiliar(es), estavelmente integrados dentro do genoma de uma célula auxiliar (por exemplo, acondicionamento). Em tais células auxiliares, as proteínas estruturais de alfa-vírus podem ser produzidas sob o controle de um promotor que pode ser um promotor indutível.

[088] Em algumas formas de realização, o ácido nucleico auxiliar empregado nos métodos desta invenção podem ser um ácido nucleico

recombinante compreendendo uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5', um elemento IRES, um ácido nucleico codificando uma proteína estrutural de alfa-vírus e uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3'.

[089] Em outras formas de realização, o ácido nucleico auxiliar pode ser um ácido nucleico recombinante, compreendendo uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5', um promotor subgenômico de alfa-vírus, um elemento IRES, um ácido nucleico codificando uma ou mais proteínas estruturais de alfa-vírus e uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3'.

[090] Adicionalmente aqui provido é um método para produzir partículas de alfa-vírus infecciosas e defeituosas, compreendendo: a) introduzir dentro de uma célula o seguinte: i) um RNA de replicon de alfa-vírus, compreendendo uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5', sequência(s) de ácido nucleico codificando proteínas não estruturais de alfa-vírus, um promotor subgenômico de alfa-vírus, uma sequência de ácido nucleico heteróloga e uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3'; e ii) um ou mais ácidos nucleicos auxiliares, codificando proteínas estruturais de alfa-vírus compreendendo uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5', um promotor subgenômico de alfa-vírus, um elemento IRES, um ácido nucleico codificando uma ou mais proteínas estruturais de alfa-vírus e uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3', por meio do que todas as proteínas estruturais de alfa-vírus são produzidas na célula; e b) produzir ditas partículas de alfa-vírus dentro da célula.

[091] Um método é também provido aqui de produzir partículas de alfa-vírus infecciosas e defeituosas, compreendendo: a) introduzir dentro de uma célula o seguinte: i) um RNA de replicon de alfa-vírus compreendendo uma sequência de reconhecimento de replicação de

alfa-vírus 5', sequências de ácido nucleico codificando proteínas não estruturais de alfa-vírus, pelo menos um promotor subgenômico de alfa-vírus, pelo menos um elemento IRES, pelo menos uma sequência de ácido nucleico heteróloga e uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3'; e ii) um ou mais ácidos nucleicos auxiliares codificando proteínas estruturais de alfa-vírus compreendendo uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5', um promotor subgenômico de alfa-vírus, um elemento IRES, um ácido nucleico codificando uma ou mais proteínas estruturais de alfa-vírus e uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3', por meio do que todas as proteínas estruturais de alfa-vírus são produzidas na célula; e b) produzir ditas partículas de alfa-vírus dentro da célula.

[092] Os métodos de produzir partículas de alfa-vírus desta invenção podem ainda compreender a etapa de coletar ditas partículas de alfa-vírus da célula.

[093] A presente invenção também provê um ácido nucleico recombinante compreendendo sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5', um promotor subgenômico de alfa-vírus, um elemento IRES, um ácido nucleico codificando uma ou mais proteínas estruturais de alfa-vírus em qualquer combinação e/ou ordem e uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3'. Em algumas formas de realização, este ácido nucleico auxiliar recombinante pode compreender uma sequência de nucleotídeo de espaçador, que pode ficar a montante de um elemento IRES. É também provido um vetor e/ou uma célula compreendendo este ácido nucleico recombinante.

[094] É adicionalmente provido aqui um ácido nucleico recombinante, compreendendo: uma primeira sequência de ácido nucleico, codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5'; pelo menos uma segunda sequência de ácido nucleico, codificando uma proteína não-estrutural de alfa-vírus; um primeiro promotor subgenômico de

alfa-vírus; um primeiro elemento IRES; um primeiro ácido nucleico heterólogo; um segundo promotor subgenômico de alfa-vírus; um segundo elemento IRES; um terceiro ácido nucleico, codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3'. Em algumas formas de realização, os primeiro e segundo promotores subgenômicos de alfa-vírus podem ser iguais ou diferentes, o primeiro e segundo elementos IRES podem ser iguais ou diferentes e/ou os primeiro e segundo ácidos nucleicos heterólogos podem ser os mesmos ou diferentes. Este ácido nucleico recombinante compreende um sinal de acondicionamento de alfa-vírus e/ou uma sequência de nucleotídeo de espaçador, que pode ficar a montante de um elemento IRES. Este ácido nucleico recombinante pode também compreender uma ou mais segundas sequências de ácido nucleico codificando proteínas não estruturais de alfa-vírus em qualquer ordem e/ou combinação, de modo que todas as sequências codificantes de proteína não-estrutural de alfa-vírus estejam presentes no ácido nucleico recombinante. Este ácido nucleico recombinante pode estar presente em uma partícula de alfa-vírus desta invenção e/ou em uma composição farmacêutica desta invenção.

[095] É também provido um ácido nucleico de replicon recombinante como descrito acima, compreendendo ainda um terceiro ou outro promotor subgenômico de alfa-vírus adicional, um terceiro ou outro elemento IRES adicional e/ou um terceiro ou outro ácido nucleico heterólogo adicional. Este ácido nucleico recombinante pode estar presente em uma partícula de alfa-vírus desta invenção e tais partículas podem estar presentes como uma população desta invenção e/ou em uma composição farmacêutica desta invenção. As partículas de alfa-vírus compreendendo esta forma de realização do ácido nucleico recombinante podem ser produzidas de acordo com qualquer um dos métodos desta invenção e podem ser usadas em qualquer um dos métodos de eliciar uma resposta imune e/ou suprir um NOI a uma célula.

[096] Como mais uma forma de realização, a presente invenção provê um ácido nucleico recombinante, compreendendo: um promotor que dirige a transcrição de um ácido nucleico; um elemento IRES; e um ácido nucleico compreendendo uma sequência codificante, em que o elemento IRES é operavelmente localizado, de modo que a tradução da sequência codificante é via um mecanismo independente de cobertura, dirigido pelo elemento IRES. Nesta forma de realização, a transcrição do ácido nucleico é desacoplada da tradução do ácido nucleico.

[097] Entende-se que a descrição detalhada precedente é dada simplesmente por meio de ilustração e que modificações e variações podem ser feitas nela sem desvio do espírito e escopo da invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1. - Construção de vetores de clonagem de transferência.

A. Vetores contendo IRES EMCV

[098] Um vetor de transferência (pCDNA3.3) foi preparado, dentro do qual a sequência IRES da encefalomiocardite (EMCV) e qualquer NOI poderia ser introduzido. O plasmídeo pCDNA3.1(+) (Nitrogênio) foi digerido com a enzima de restrição Bathe e tratado com polimerase DNA T4, para eliminar o único sítio de restrição Bathe, resultando em geração de pCDNA3.2. O DNA de pDNA3.2 foi ainda digerido com a enzima de restrição Bay e também tratado com polimerase de DNA T4, para remover o único sítio de restrição Bay, resultando na geração de pCDNA3.3.

[099] Um vetor de clonagem intermediário, contendo o múltiplo sítio de clonagem (MCS) de um vetor de replicon VEE, foi preparado legando-se um fragmento MCS ApaI/NotI ~250pb dentro de DNA KS+ pBluescript (Stratagene) linearizado ApaI/NotI, gerando pKS-rep2. O IRES EMCV foi digerido de pD1+2+3 (Kaminski e outros, 1995) com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI e ligado dentro do DNA Pks-REP2 linearizado EcoRI e BamHI, gerando pKS-rep2/EMCV. O IRES EMCV e a

sequência MCS do vetor pKS-rep2/EMCV foram amplificados PCR, empregando-se os iniciadores EMCVF(AscI).2 e EMCVR(AscI).1 (Tabela 1). O produto PCR EMCV foi digerido com enzima de restrição AscI e ligado dentro de dna de vetor de replicon VEE linearizado AscI (pERK), gerando pERK/EMCV. Para completar o vetor de clonagem de transferência, DNA EMCV/pERK foi digerido com EcoRV e enzimas de restrição NotI e o fragmento NotI/EcoRV de 862 pb foi ligado dentro de DNA pCDN A3.3 linearizado EcoRV e NotI, gerando pCDNA3.3/EMCV. A sequência do IRES EMCV e múltiplos sítios de clonagem associados foi confirmada no vetor EMCV/pCDNA3.3, antes de preparar mais construções com ela.

Tabela 1

Nome do Iniciador	5'	Sequência de Iniciador	3'
EMCVF(AscI).2	TGGCGCGCCGCTCGGAATTCCCCCTCTCCC		
EMCVR(AscI).1	AGGCGCGCCTTCTATGTAAGCAGCTTGCC		
F'-CAT(BamHI)	GCTGGATCCATGGAGAAAAAATCACTGGA		
R'-CAT(XbaI)	CGATCTAGATTACGCCCCGCCCTGCCACTCA		
Anti-En(EcoRI)	CGGAATTCATTATCATCGTGTTTTTC		
Anti-EN(BamHI)	CGGGATCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGC		
Anti-En(AscI)	AGGCGCGCCATTATCATCGTGTTTTTC		
dAvr En(AscI)	AGGCGCGCCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTC		
R			
3' UTR4Xbiotina	GCGGCATGCCAATCGCCGCGAGTTCTATGTAAGCAGCTTGCC		
GAG-F	CGGGATCCATGGCTGCGAGAGCGTCA		
GAG-R	CGGGATCCTTATTGAGACAAGGGGTTCGC		

B. Vetores contendo IRES XIAP

[0100] O inibidor ligado-X da região não codificante (NCR) 5' do gene apoptose (XIAP), contendo o elemento IRES putativo (vide Holcik e outros (1999) Nature Cell Biol 1: 190-192; Holcik e Korneluk (2000) Mol Cell Biol 20:4648 – 57 e Holcik e outros (2003) Mol Cell Biol 23:280-288 para a sequência e tamanho do elemento) foi PCR amplificada de cDNA pronto de maratona de fígado fetal humano (Clontech, Palo Alto, CA), empregando-se um iniciador adaptador e um iniciador inverso XIAP (XIAP-R) seguido por um PCR aninhado, empregando-se iniciadores específicos IRES XIAP. Os iniciadores são listados na Tabela 2. Produtos PCR

resultantes de aproximadamente 1007 e 241 pb foram clonados TA, empregando-se um kit comercialmente disponível (Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA). Estas construções possuem 844 nucleotídeos ou 78 nucleotídeos, respectivamente, da região não-codificante de gene XIAP, além do IRES XIAP putativo de 163 nucleotídeos. As sequências para cada construção foram confirmadas por sequenciamento de DNA automatizado. Para gerar vetores lançadeira para clonagem dentro do replicon VEE, as sequências XIAP foram transferidas como um fragmento EcoRI para dentro do sítio equivalente de pKS-rep2, gerando DNAs pKS-rep2/XIAP1007 e pKS-rep2/XIAP241.

Tabela 2

XIAP-R	5'-CCCTGCTCGTGCCAGTGTGATGC-3'
XIAP/IRES-1007	5'-ACACGTGGGGCAACCCTGATTTATGCCTGTTGTCC-3'
XIAP/IRES-241	5'-AGTTAACTCAAAAAGAGAAAACAAAATGC
XIAP/IRES-R	5'-AGATATCTTCTCTTGAAAATAGGACTTGTCCAC-3'
Cap5'F	5'-GTTCCCGTTCCAGCCAATGTATCCG-3'
13-87pr1	5'-GTCAGTGTGACCACCATGT-3'
3-1.lpr1	5'-TAAGAGCCGCGAGCGATCCT-3'

1007 bp XIAP 5'NCR

ACACGTGGGGCAACCCTGATTTATGCCTGTTGTCCAGTGTGATTATTACT
 AGTGTAATTTTTCACTTTGAGAAGTGTCCAGGTTTGGAGGATAAATTATCT
 TTCTAATAATTGATACCCTTCTCATAACCTAACGGGTTCCTTTTAGTATTTT
 ATCTGGGTTAAAATTACCAGCTGTAATTTGGCAGCTCTAATAAGACTGCA
 GCAATACTTATCTTCCATTTGAACAGATTGTTACTTGACCAAGGGAAGTTA
 ATAGCAAAAGTAACTGCAGGGCACATGTATGTCATGGGCAAAAAAAAAA
 AAGTAACAGCAATTAAGGTTTGCAGGTTACTTAGAATTTTTCCTGAGCCACC
 CTCTAGAGGGCAGTGTACATATATATCTGTAATTATCCAGTTACAACAAA
 AAAAGGGCTCTCATTGATGCATGAAAATCAGAAATATTTTCATACTCTTAA
 AGAACACATTGGAACCAATATTATGATTAACATATTTTGCTAAGCAAA
 GAGATATTAATAATTAATTCATTAACATTCTGAACATTTTAACTTGTA
 AAACAACCTTTGATGCCTTGAATATATAATGATTCATTATAACAATTATGCA
 TAGATTTAATAATCTGCATATTTTATGCTTTCATGTTTTTCCTAATTAATG
 ATTTGACATGGTTAATAATTATAATATATTCTGCATCACAGTTTACATATT
 TATGTAATAAGCATTAAATAATTATTAGTTTTATTCTGCCTGCTTAAAT

ATTACTTTCCTCAAAAAGAGAAAACAAAATGCTAGATTTTACTTTATGAC
 TTGAATGATGTGGTAATGTCGAACTCTAGTATTTAGAATTAGAATGTTTCT
 TAGCGGTCGTGTAGTTATTTTTATGTCATAAGTGGATAATTTGTTAGCTCC
 TATAACAAAAGTCTGTTGCTTGTGTTTCACATTTTGGATTTCCCTAATATAAT
 GTTCTCTTTTATAGAAAAGGTGGACAAGTCCTATTTTCAAGAGAAGAT

Exemplo 2 – Construção de vetores replicon aperfeiçoados

A. Construções contendo o IRES EMCV

[0101] Para demonstrar a funcionalidade de uma sequência IRES colocada a jusante de um promotor 26S de alfa-vírus funcional, genes repórteres foram subclonados dentro do vetor de transferência pCDNA3.3/EMCV e em seguida o cassete de EMCV/gene repórter foi movido para dentro do vetor de replicon pERK. Experimentos iniciais foram conduzidos empregando-se um vetor de replicon expressando o gene repórter da Cloramfenicol acetil transferase (CAT). O gene CAT foi amplificado utilizando-se iniciadores F'-CAT (BamHI) e R'-CAT (XbaI) (Tabela 1). O produto PCR foi digerido com enzimas de restrição BamHI e XbaI e ligados dentro de DNA EMCV/pCDNA3.3 linearizado XbaI/BamHI, gerando pCDNA3.3/EMCV/CAT. Após a sequência do gene CAT ter sido confirmada, DNA pCDNA3.3/EMCV/CAT foi digerido com enzima de restrição AscI, para liberar um fragmento EMCV/CAT de 1300 pb. O fragmento EMCV/CAT digerido AscI foi então ligado dentro de DNA do vetor pERK linearizado AscI, gerando pERK/EMCV/CAT.

[0102] Foi mostrado que IRES EMCV tem uma atividade direcional e, quando ele está na orientação errada, com respeito a NOI, não é observada tradução independente de cobertura (Roberts e Belsham (1997) Virology 227:53-62). Além disso, a deleção das sequências terminais 5' de IRES EMCV abole a tradução independente de cobertura, no contexto de um vetor de expressão dicistrônica (Van der Velden e outros (1995) Virology 214: 82-90; Jang & Wimmer (1990) Genes & Development 4:1560-72). Para demonstrar que a tradução independente de cobertura do gene CAT está

ocorrendo, dois vetores pERK idênticos a pERK/EMCV/CAT foram preparados somente com IRES EMCV na orientação anti-sentido (pERK/anti-EMCV/CAT) ou com uma deleção 5' das sequências terminais de IRES EMCV (pERK/ Δ Avr/CAT).

[0103] Uma versão anti-sentido do IRES EMCV foi amplificada PCR de DNA rep2/EMCV pKS, empregando-se iniciadores anti-Em(EcoRI) e anti-Em(BamHI) (Tabela 1). O fragmento IRES EMCV amplificado foi digerido com enzimas de restrição EcoRI e BamHI e ligado dentro de DNA pKS-rep2 linearizado EcoRI/BamHI, gerando pKS-rep2/anti-EMCV. O gene CAT digerido BamXI/XbaI, descrito acima, foi ligado dentro de DNA pKS-rep2/anti-EMCV linearizado BamHI/XbaI, gerando pKS-rep2/anti-EMCV/CAT. O cassete de gene anti-EMCV/CAT de 1295 pb foi amplificado PCR de DNA pKS-rep2/anti-EMCV/CAT, empregando-se iniciadores EMCVR (AscI).I e anti-En(AscI) (Tabela 1). Finalmente, o fragmento anti-EMCV/CAT foi digerido com enzima de restrição AscI e ligado dentro de DNA de vetor pERK linearizado AscI, gerando pERK/anti-EMCV/CAT. A sequência da região de gene anti-EMCV/CAT foi confirmada antes de mais experimentos serem realizados.

[0104] Para gerar o vetor pERK Δ Avr/CAT, primeiro a deleção Δ Avr foi feita em IRES EMCV encontrado no vetor intermediário pKS-rep2/EMCV. A deleção foi realizada digerindo-se DNA pKS-rep2/EMCV com enzimas de restrição tanto EcoRI como AvrII, deletando 145 pb da região 5' do IRES EMCV. O DNA linearizado foi tratado com polimerase DNA T4, para criar extremidades embotadas e religado para gerar DNA pKS-rep2/ Δ Avr. O gene CAT foi clonado dentro do vetor intermediário ligando-se o gene CAT BamHI/XbaI descrito acima dentro de pKS-rep2/ Δ Avr linearizado com enzima de restrição BamHI e XbaI, gerando DNA pKS-rep2/ Δ Avr/CAT. O cassete de gene Δ Avr/CAT de 1177 pb foi amplificado PCR de pKS-rep2/ Δ Avr/CAT. DNA empregando iniciadores

EMCVR(AscI).1 e dAVr En(AscI) R (Tabela 1). Finalmente, o fragmento Δ AVr/CAT foi digerido com enzima de restrição AscI e ligado dentro de DNA de vetor pERK linearizado AscI, gerando pERK/ Δ AVr/CAT. A sequência da região genética Δ AVr/CAT foi confirmada antes de serem realizados outros experimentos.

B. Construções contendo IRES EV71

[0105] O elemento IRES do enterovírus humano 71 (EV71) (Thompson e Sarnow (2003) Virology 315: 259-266) foi clonado em orientações tanto de sentido como de anti-sentido dentro dos vetores de replicon de espaçador e analisado quanto à expressão de um gene repórter CAT. O elemento IRES EV71 (cepa 7423/MS/87) foi amplificada PCR de DNA pdc/MS (Thompson e Sarnow, 2003) empregando-se iniciadores, para produzir um fragmento de sentido (dc/MS (EcoRI) F e dc/MS (BamHI) R) e um fragmento anti-sentido (dc/anti-MS (EcoRI) R e dc/anti-MS (BamHI) F) (Tabela 3). Os produtos PCR IRES EV71-MS de sentido e anti-sentido foram digeridos com enzimas de restrição EcoRI e BamHI e ligados dentro de pCDNA3.3 (vide Exemplo 1) linearizado com EcoRI e BamHI, gerando pCDNA3.3/MS e pCDNA3.3/anti-MS. As regiões IRES EV71-MS, de cada vetor pCDNA3.3, foram seqüenciadas para verificar que não foram introduzidas mudanças de nucleotídeo durante a amplificação PCR, antes de serem iniciados mais experimentos.

[0106] O gene repórter CAT, como descrito acima em A, foi clonado dentro de vetores pCDNA3.3/MS e pCDNA3.3/anti-MS linearizados BamHI e XbaI, gerando pCDNA3.3/MS/CAT e pCDNA3.3/anti-MS/CAT, respectivamente. Construções de replicon de espaçador foram produzidas digerindo-se os DNAs pCDNA3.3/MS/CAT e pCDNA3.3/anti-MS/CAT COM enzima de restrição AscI e ligando-se os fragmentos AscI MS-CAT ou anti-MS-CAT dentro dos vetores de replicon de espaçador. A região de espaçador-IRES-CAT de cada vetor foi seqüenciada, para verificar

que não haviam sido introduzidas mudanças durante a clonagem, antes de mais experimentos serem iniciados.

Tabela 3

Iniciador	Seqüência 5' – 3'
dc/MS(EcoRI) F	CGAATTCTTAAAACAGCTGTGGGTTG
dc/MS (BamHI) R	CGGGATCCGGTCAACTGTATTGAGGGTTAATATAAAG
dc/anti-MS(BamHI) F	CGGGATCCTTAAAACAGCTGTGGGTTGTTCCAC
dc/anti-MS(EcoRI) R	GGAATTCGGTCAACTGTATTGAGGGTTAATATAAAG

C. Construções contendo IRES XIAP

[0107] O gene CAT foi clonado dentro dos sítios EcoRV e BamHI de pKS-rep2/XIAP1007 (vide exemplos abaixo), após amplificação PCR do gene, empregando-se iniciadores CATF (5'-GGAGAAAAAATCACTGGATATAC-3') e CATR(Bam) (5'-GGGGATCCTTACGCCCCGCCCTGCCAC-3'), gerando pKS-rep2/XIAP/CAT 1007. Esta estratégia reconstitui o sítio de início do gene XIAP tipo selvagem. O intermediário foi então clonado como um fragmento ApaI/SpHI dentro de pERK, para gerar pERK/XIAP/CAT 1007. Em seguida a transcrição *in vitro* e eletroporação dentro de células Vero, produções VRP e expressão de proteína CAT em células infectadas foram determinadas e comparadas com pERK/EMCV/CAT 342. As produções VRP eram equivalentes para ambas as construções. Nesta construção particular, foi possível modificar o nível de expressão da proteína CAT, empregando-se IRES XIAP (3,97 E5 ng/μg), em comparação com IRES EMCV (1,08 e6 ng/μg), assim demonstrando a utilidade de diferentes IRESs na invenção reivindicada.

D. Construções expressando HIVgp160

[0108] Um replicon expressando o gene C do grupo HIVgp160 foi construído, em que a tradução de HIVgp160 foi dirigida pelo

IRES EMCV. Nesta construção, o espaçador de 167 pb da construção auxiliar pH1500A/EMCV/Vcap (vide Exemplo 4.B.1) foi clonado dentro de uma construção de replicon IRES EMCV, como segue. O DNA pH1500A/EMCV/Vcap foi digerida com enzima de restrição ApaI, para liberar um fragmento com 194 pb, contendo o espaçador de 167 pb e uma parte de IRES EMCV. Um vetor pERK/EMCV 749 foi também digerido com enzima de restrição ApaI e o fragmento ApaI de espaçador de 749 pb liberado foi substituído pelo fragmento ApaI de espaçador de 167 pb, gerando o vetor pERK/EMCV 167. Para demonstrar que um gene heterólogo poderia também ser eficientemente expresso e acondicionado pelo vetor de replicon pERK/EMCV 167, o gene de grupo HIV C gp160 (Williamson C e outros (2003) AIDS Res Hum Retroviruses 19:133-44) foi clonado dentro deste vetor como segue. O gene HIV gp160 foi amplificado (utilizando-se iniciadores env-5'-XbaI e DU151gp160 3'-XbaI) (Tabela 4) e clonado dentro de pCR-XL-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA), gerando pCR-XL-TOPO/gp160. O gene gp160 foi seqüenciado pra assegurar que não fossem introduzidos erros durante a amplificação PCR, antes de iniciar mais estudos. O DNA pCR-XL-TOPO/gp160 foi digerido com enzima de restrição XbaI e o fragmento gp160 foi então ligado dentro de pCDNA3.3/EMCV linearizado XbaI, gerando pCDNA3.3/EMCV/gp160. O DNA pCDNA3.3/EMCV/gp160 foi digerido com enzima de restrição AscI, para liberar o fragmento EMCV/gp160. O fragmento EMCV/gp160 foi então ligado dentro do DNA de vetor pERK/EMCV 167, gerando o vetor pERK/EMCV/gp160 167.

Tabela 4

Iniciador	Seqüência 5'-3'
Env-5'-XbaI	CGACATAGTCTAGACCGCCAAGATGAGAGTGATGG
DU151gp160 3'-XbaI	GATCTCTAGATTATTGCAAAGCTGCTTCAAAGCCC

E. Construção de duplos replicons IRES subgenômicos, expressando múltiplos NOIs.

[0109] Um vetor de replicon IRES, codificando dois

cassetes 26S-espçador-IRES-NOI em srie foi construdo. O vetor pERK bsico, usado para gerar os replicons IRES subgenmicos (pERK MCS2), continha uma regio de espçador de 342 pb a jusante do promotor 26S e codificou para os seguintes stios de restrio de seu MCS (5' AscI, SnaBI, SphI 3).

[0110] A parte de terminal-C da cadeia pesada (Hc) das neurotoxinas de botulnio A e B (BoNT A e BoNT B) foi clonada dentro de pCDNA3.3/EMCV como fragmentos BamHI/XbaI, gerando pCDNA3.3/EMCV/BoNT A e pCDNA3.3/EMCV/BoNT B, respectivamente. Os genes BoNT foram digeridos para fora dos vetores pCDNA3.3/EMCV com enzima de restrio AscI e os cassetes EMCV/BoNT AscI foram ligados dentro do DNA MCS2 pERK linearizado AscI, gerando vetores monovalentes MCS2 pERK/BoNT e MCS2 pERK/BoNT B. A orientao da insero foi determinada por anlise de restrio e clones com inseres na orientao de sentido foram isolados. Os genes IRES e BoNT EMCV foram seqnciados, para verificar que no haviam sido introduzidos erros durante a clonagem, antes de mais experimentos serem iniciados.

[0111] Para gerar a dupla construo de replicon IRES BoNT A/B subgenmico (MCS2 pERK-BoNT A/B), os vetores MCS 2 pERK BoNT foram utilizados. O vetor MCS2 pERK/BoNT B foi parcialmente digerido com enzima de restrio PspOM I e as terminaes foram tornadas embotadas, utilizando-se polimerase DNA T4 . O DNA MCS2 pERK/BoNT B foi ainda digerido com enzima de restrio SphI, para liberar um fragmento de espçador-EMC-BoNT B 26S-342pb. O fragmento espçador-EMCV-BoNT b 26S-342 pb foi ento ligado dentro de DNA MCS2 pERK/BoNT A digerido SnaBI/SphI, gerando o vetor MCS2 pERK-BoNT A/B. A estrutura final da construo  5' NCR-nsP1,2,3,4 – 26S-342pb espçador-EMCV-BoNT A-26S-342 pb espçador-EMCV-BoNT B-NCR 3'. A sequncia do replicon IRES subgenmico duplo foi verificado

antes de serem conduzidos os estudos de expressão e acondicionamento VRP.

F. Construção de um replicon S.A. AR86 contendo-IRES

[0112] Um vetor de replicon, derivado de S.A.AR86 (pRep89; descrito em Heise e outros J. Virol. 2003 77(2):1149-56) foi modificado para conter um cassete gag espaçador-EMCV-HIV 342 pb a jusante do promotor 26S. O fragmento gag espaçador-EMCV-HIV 342pb foi amplificado PCR de DNA pERK/EMCV/gag 342, utilizando-se iniciador de preenchimento 342 (ClaI) e 3-42.pr4 (Tabela 5). Amplificação com o iniciador 3-42.pr4 permite a incorporação de sítio ClaI 3', que existe logo a jusante do gene gag HIV do DNA pERK/EMCV/gag 342. O produto PCR foi então digerido com enzima de restrição ClaI e ligado dentro de pRep89 linearizado ClaI, gerando o vetor pRep89/EMCV/gag 342. A inteira região inserida foi seqüenciada, para assegurar que não tinham sido introduzidos erros durante a amplificação PCR.

Tabela 5

Iniciador	Seqüência 5' -3'
stuffer 342 (ClaI)	CCATCGATCTATTCCAGAAGTAGTGAGG
3-42.pr4	CAATCGCCGCGAGTTCATG

Exemplo 3. Análise de expressão NOI de replicons dirigidos-IRES

A. Expressão de replicon IRES EMCV

1. Expressão CAT

[0113] A expressão de proteína CAT foi examinada utilizando-se as construções de replicon pERK/EMCV/CAT, pERK/anti-EMCV/CAT e pERK/ Δ Avr/CAT. RNAs de replicon com cap foram transcritos *in vitro*, utilizando-se um kit RiboMax T7 (Promega, Corporation; Madison, WI; Cat. No. P1300). RNAs foram purificados utilizando-se colunas de purificação RNeasy (Qiagen Corporation, Germantown, MD), seguindo-se as instruções dos fabricantes. Células Vero (células 6×10^6), suspensas em 0,4 ml de meio de cultura de células quimicamente definido InVitrus™ (Cell Culture Technologies GmbH, Zurich, CH; Catalog No. IVT) e

eletroporadas com 15 µg de RNA pERK/EMCV/CAT ou pERK/anti-EMCV/CAT, empregando-se um Bio Rad Gene Pulser (BioRad Laboratories, Hercules, CA). As células foram pulsadas quatro vezes com o eletroporador ajustado a 290 voltes e 25 microfarads. A expressão CAT foi detectada por IFA, utilizando-se um anticorpo anti-CAT de coelho em células fixadas por metanol e por ELISA, empregando-se lisados de células eletroporadas e um kit ELISA CAT comercialmente disponível (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN).

[0114] Fragmentos de DNA aleatórios foram clonados entre a sequência IRES EMCV e o promotor subgenômico VEE em um único sítio EcoRV, localizado nos vetores pERK. Os pequenos fragmentos de DNA, clonados entre o promotor 26S e o IRES EMCV vieram de DNA de enzima de restrição AluI, digerida pCDNA3.1(-). A enzima de restrição AluI cortava freqüentemente dentro de DNA pCDNA3.1(-), resultando em fragmentos de extremidade embotada, variando em tamanho de 706 pb a 6 pb. Os fragmentos pCDNA3.1(-) digeridos AluI foram ligados dentro de DNAs pERK/EMCV/CAT, pERK/anti-EMCV/CAT e pERK/ΔAvr/CAT linearizados EcoRV. Clones individuais foram seqüenciados, para determinar que fragmento espaçador tinha sido clonado dentro de cada novo vetor. O tamanho de alguns dos fragmentos de espaçador encontrados nos vetores era maior do que o fragmento AluI pCDNA3.1(-), devido à ligação de múltiplos fragmentos dentro da região de espaçador destes replicons. Cada replicon de IRES-espaçador foi transcrito e o RNA eletroporado dentro de células Vero, como descrito acima. A expressão de proteína CAT foi monitorada por ELISA CAT e os resultados são resumidos na Tabela 6.

Tabela 6. Análise de expressão CAT de replicons contendo EMCV-IRES

Replicon	Tamanho do fragmento espaçador	ng CAT/ μ g proteína tot.
pERK/anti-EMCV/CAT	133	2.1
pERK/EMCV/CAT	234	9.9
pERK/anti-EMCV/CAT	234	1.5
pERK/ Δ Avr/CAT	234	0.4
pERK/ Δ Avr/CAT	226	0.5
pERK/EMCV/CAT	342	10.3
pERK/anti-EMCV/CAT	357	0.1
pERK/EMCV/CAT	805	7.4
pERK/anti-EMCV/CAT	706	0.5
pERK/ Δ Avr/CAT	681	0.02

[0115] Os resultados indicam que a expressão CAT das construções de replicon pERK/IRES/CAT, contendo os fragmentos de espaçador, é robusta e dirigida pelo IRES, em comparação com vetores similares sem fragmentos de espaçador (aproximadamente 4-7 ng CAT/ μ g proteína total). Os níveis mais elevados de expressão do gene heterólogo ocorreram quando fragmentos de espaçador maiores do que aproximadamente 200 nucleotídeos foram introduzidos entre o promotor 26S e as sequências IRES EMCV.

2. Expressão de múltiplos NOIs de um único replicon

[0116] A expressão e acondicionamento do replicon MCS2 pERK-BoNT A/B foram realizados em células Vero. RNA de replicon pERK-BoNT A/B com cap foi transcrito e purificado como descrito acima. Células Vero (1×10^8 células) foram eletroporadas com 30 μ g de RNA de replicon, 30 μ g de RNA auxiliar capsídeo e 30 μ g de RNA auxiliar de glicoproteína. As células eletroporadas foram analisadas por IFA, empregando-se anticorpos de cavalo anti-BoNT A e BoNT B (Perimmune, Rockville, MD) antes que VRP fossem colhidos. Os resultados do IFA e titulação de VRP gerados são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7

Replicon	IFA Anti-BoNT A	IFA Anti-BoNT B	Título VRP
MCS2 pERK-BoNT A/B	Positivo	Positivo	2 x 10 ⁹ VRP

3. Expressão gp160 HIV

[0117] O replicon pERK/EMCV/gp160 167 (Exemplo 2D) foi analisado quanto à expressão do gene gp160 e geração VRP. RNA purificado foi preparado para o replicon, de auxiliar de GP e de auxiliar de capsídeo, como descrito acima. Células Vero foram eletroporadas com os RNAs e VRP foram coletados 20 – 24 h pós eletroporação. Os resultados de titulação de IFA e VRP são resumidos na Tabela 8. Para comparação, um replicon pERK, expressando gp160 diretamente do promotor 26S foi também avaliado.

Tabela 8

Replicon	IFA anti-gp160	Título VRP/ml
pERK/gp160	Positivo	2,1 x 10 ⁸
pERK/EMCV/gp160 167	Positivo	2,5 x 10 ⁵

4. Expressão GAG HIV de um Replicon S.A. AR86

[0118] DNA pRep89/EMCV/gag 342 foi transcrito *in vitro*, utilizando-se um kit RiboMax SP6 (Promega Corporation; Madison, WI; Cat No. P1280, para gerar RNA replicon com cap. O RNA foi purificado utilizando-se colunas de purificação RNeasy (Qiagen Corporation, Germantown, MD) seguindo-se as instruções dos fabricantes. Células Vero (1 x 10⁸ células) foram eletroporadas com 30 ug de RNA Rep89/EMCV/gag 342 e em seguida analisadas quanto à expressão de proteína Gag ~18 h pós eletroporação. A análise IFA anti-Gag de células eletroporadas Rep89/EMCV/gag 342 foi positiva quanto à expressão de proteína Gag.

B. Expressão de replicon IRES EV71-MS

[0119] Expressão de proteína CAT de cada EV71-MS contendo replicon foi realizada em Células Vero. RNA de replicon com cap foi transcrito e purificado como descrito acima. Células Vero (2-3 x 10⁷ células) foram eletroporadas com 30 µg de RNA de replicon. As células

eletroporadas foram analisadas por IFA utilizando-se anti-CAT (Córtex Bichem, San Leandro, CA) e anticorpos nsp2 anti-VEE (Alpha Vax) aproximadamente 18 h pós eletroporação. Além disso, a expressão CAT foi monitorada por ELISA, como descrito acima. Os resultados de ELISA IFA e CAT, comparando-se a atividade detectada de replicons pERK/EMCV/CAT 342 e pERK/MS/CAT 342, são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9

Replicon	IFA anti-CAT	IFA nsp2 anti VEE	ng CAT/ μ g proteína	% redução de tradução
pERK/MS/CAT 342	+	+	20,1	NA
pERK/anti-MS/CAT 342	-	+	0,6	97%
pERK/EMCV/CAT 342	+	+	14,8	NA
pERK/ Δ Avr/CAT 342	-	+	0,0	> 99%

Exemplo 4. – Tradução dirigida-IRES com diferentes espaçadores

A. Construções de Replicon

1. Construções contendo IRES EMCV

[0120] Foram preparados pares de construções de replicon, codificando para sequências IRES EMCV ou anti-sentido-EMCV, que continham exatamente a mesma região de espaçador. Estas comparações demonstram que somente as sequências IRES EMCV na orientação de sentido (isto é, na orientação 5'-3' em que a sequência é encontrada no vírus) dirigem a tradução independente de cobertura; isto é, muito pouca tradução ocorre quando o IRES está em uma orientação anti-sentido, indicando que um elemento IRES apropriadamente orientado é necessário para obter significativa expressão CAT nestas construções. Estas construções de replicon foram preparadas como descrito acima. Cada replicon IRES-espaçador foi transcrito *in vivo* e 30 μ g de cada RNA purificado foram eletroporados dentro de $\sim 1 \times 10^7$ células Vero, como descrito acima. A expressão de proteína CAT foi monitorada por ELISA CAT e os resultados são resumidos na Tabela 10.

Tabela 10. Comparação de expressão CAT empregando replicons EMCV-espaçador ou anti-EMCV espaçador.

Replicon	Tamanho do fragmento espaçador	ng CAT/ µg proteína total	Replicon	Tamanho do fragmento espaçador	ng CAT/ µg proteína total	% de Redução na tradução*	Vezes de aumento na tradução*
EMCV/CAT	257	16,9	anti-EMCV/CAT	257	3,1	82,7	5,5
EMCV/CAT	342	35,6	anti-EMCV/CAT	342	0,2	99,4	178
EMCV/CAT	357	7,6	anti-EMCV/CAT	357	0,4	94,7	19
EMCV/CAT	383	28,7	anti-EMCV/CAT	383	0,6	97,9	48
EMCV/CAT	579	40,0	anti-EMCV/CAT	579	0,3	99,2	133
EMCV/CAT	749	6,74	anti-EMCV/CAT	749	0,03	99,5	224

*% de redução de tradução das construções IRES orientadas anti-sentido, em relação às construções dirigidas por IRES, orientadas no sentido.

Vezes de aumento de tradução do elemento IRES orientado no sentido, em relação à tradução de construções com um elemento IRES orientado anti-sentido.

[0121] Os dados mostram que a expressão de proteína CAT foi grandemente reduzida (na maioria dos casos > 95%), quando o replicon continha um IRES EMCV espaçador e um anti-sentido, a montante do gene CAT. Além disso, os dados demonstram de um sistema de expressão de proteína dirigido por IRES otimizar o nível de expressão de NOI. A otimização é específica-NOI, porém, utilizando-se os ensinamentos aqui, a identificação das combinações IRES-espaçador, que fornecem o desejado nível de expressão para qualquer dado NOI, seria rotina para uma pessoa de habilidade comum na técnica.

2. Uso de um espaçador derivado de uma região não-codificadora 5'

[0122] Um replicon pERK foi construído para conter o gene de proteína de capsídeo VEE de comprimento total por PCR, amplificando a sequência de capsídeo pH500A/Vcap, utilizando-se os iniciadores Cap5'F e 3-1.1prl (Tabela 11). O produto PCR resultante foi inserido dentro dos sítios da enzima de restrição EcoRV e SphI de pERK. “pERK/capsídeo” foi modificado ainda para conter uma única enzima de restrição AscI na terminação 3' do gene de capsídeo, utilizando-se iniciadores AscIF e AscIR (Tabela 11) para mutagênese dirigida ao sítio, empregando-se

um kit comercialmente disponível (Stratagene). Truncagens seriais da sequência de capsídeo VEE foram então geradas por amplificação PCR das sequências de pERK/Capsídeo, empregando-se um iniciador para diante (13-82.2.16), que recoze dentro do gene nsP4, e iniciadores inversos (Tabela 11), que foram construídos para conter um sítio de enzima de restrição AscI. Os produtos PCR foram digeridos com ApaI e AscI ou SwaI e AscI e clonados de volta dentro de pERK/Capsídeo, para gerar pERK/Cap200, pERK/Cap400 e pERK/Cap600. Estes replicons retêm quantidades crescentes de sequência da terminação 5' do gene de capsídeo, para funcionar como um “espaçador” entre o promotor 26S e as construções a montante, a serem inseridas. Para introduzir um cassete EMCV/CAT dentro de cada um dos vetores pERK/Cap descritos acima, DNA de pCDNA3.3/EMCV/CAT foi digerido com enzima de restrição AscI, para liberar um fragmento EMCV/CAT de 1303 pb. O fragmento EMCV/CAT digerido AscI foi então ligado dentro dos DNAs de vetor pERK/Cap linearizados AscI, gerando Cap pERK/EMCV/CAT 200, Cap pERK/EMCV/CAT 400 e Cap pERK/EMCV/CAT 600.

Tabela 11: Iniciadores para gerar replicons de espaçador de capsídeo

Cap5°F	5'-GTTCCCGTTCCAGCCAATGTATCCG-3'
3-1.1pr1	5'-TAAGAGCCGCGAGCGATCCT-3'
AscIF	5'-CCGCGAGTTCTATGTAAGCGGCGCGCCAATTGTTAC AGACACATGGTGG-3'
AscIR	5'-CCACCATGTGTCTGTAACAATTGGCGCGCCGCTTACA TAGAACTCGCGG-3'
13-82.2.16	5'-GCTCTTTTTCGGAAGACACATAAT-3'
CAP200(AscI)	5'- TTGGCGCGCCTTCTTCGGTTTCTTAGCGGATGGCCC-3'
CAP400(AscI)	5'- TTGGCGCGCCCTTCCAACATGATTGGGAACG-3'
CAP600(AscI)	5'- TTGGCGCGCCTGTAATAGCCTTGGGGTTTCTCATGGG- 3'

[0123] Estes replicons, contendo partes da região 5' do gene capsídeo VEE, foram linearizados, transcritos *in vitro*, eletroporado dentro de células Vero e analisados quanto à expressão de proteína CAT por

IFA e ELISA. A expressão de proteína CAT foi verificada por IFA, utilizando-se anticorpos específicos-CAT; entretanto, a intensidade de imunofluorescência variou, dependendo do comprimento do espaçador de gene capsídeo usado. Estes resultados foram refletidos em ELISA CAT (Tabela 12).

Tabela 12: Expressão de proteína Cat de replicons contendo espaçadores de gene capsídeo

Construção	CAT IFA	nsP2 IFA	Proteína CAT
pERK/EMCV/CAT Cap 200	75%	95%	29 ng/μg proteína tot.
pERK/EMCV/CAT Cap 400	60%	95%	2 ng/μg proteína tot.
pERK/EMCV/CAT Cap 600	60%	95%	5 ng/μg proteína tot.
pERK/EMCV/CAT 342	50%	50%	14 ng/μg proteína tot.

Construção – IFA CAT – IFA nsP2 – Proteína CAT -... ng/μg prot. total –

B. Construções auxiliares

1. Construções compreendendo IRES EMCV

[0124] Foram construídos auxiliares, que individualmente expressavam os genes da glicoproteína VEE (“GP”) ou o gene de capsídeo VEE. Inicialmente, dois vetores de cadeia principal auxiliares vazios foram gerados para facilitar a construção de IRES-espaçador contendo auxiliar de capsídeo e GP. Um auxiliar vazio foi gerado digerindo-se o vetor pERK com enzimas de restrição ApaI e RsrII, para remover 6989 pb da região de codificação de proteína não estrutural. O DNA foi tratado com polimerase DNA T4, para produzir extremidades embotadas, antes de ligar o vetor pERK deletado-gene não estrutural, para produzir pH500G. O auxiliar vazio pH500G continha aproximadamente 500 nucleotídeos da região não-codificante 5’ (NCR). O segundo auxiliar vazio foi gerado digerindo-se o vetor pERK com enzimas de restrição SwaI e RsrII, para remover 6449 pb da região de codificação de proteína não estrutural. O DNA foi tratado com polimerase DNA T4, para produzir extremidades embotadas, antes de ligar o DNA, gerando pH1500G. O auxiliar vazio pH1500G continha

aproximadamente 1500 nucleotídeos da NCR 5', incluindo 540 pb adicionais do gene nsp4, imediatamente a montante do promotor 26S, que não está presente no auxiliar de pH500G. Construções auxiliares vazias foram também preparadas, que codificavam para um resíduo A em vez de G, no nucleotídeo 3 (pH500A e pH1500A). Estas construções foram preparadas subclonando-se a região 5' NCR de um auxiliar de capsídeo (pH500A/V cap), que contém um A no nucleotídeo 3, em lugar da mesma região de pH500G e pH1500G. Isto foi realizado digerindo-se pH500A/Vcap com enzimas de restrição XbaI e SacI, coletando-se o fragmento de 430 bp e ligando-o dentro de DNAs de pH500G e pH1500G digeridos por XbaI e SacI, gerando pH500A e pH1500A respectivamente.

[0125] Os genes de capsídeo e GP foram clonados dentro de pCDNA3.3/EMCV e pKS-rep2/anti-EMCV como fragmentos BamHI e XbaI, como descrito acima. Os cassetes de EMCV/capsídeo, anti-EMCV/capsídeo, EMCV/GP e anti-EMCV/GP foram clonados dentro de construções auxiliares vazias pH500G, pH500A, pH1500G e pH1500A como fragmentos AscI, como descrito acima. A sequência de cada auxiliar foi confirmada antes de serem iniciados mais experimentos.

Fragmentos de espaçador aleatórios foram clonados entre o promotor 26S e IRES EMCV ou anti-EMCV de cada auxiliar, em um único sítio EcoRV, como anteriormente descrito. As sequências e comprimento dos fragmentos de espaçador inseridos foram determinados para cada novo auxiliar e o comprimento da inserção de espaçador é incluído na extremidade da designação de construção. Os espaçadores #15, 16 e 22 não foram ainda caracterizados. As construções pH500A/EMCV/GP e pH500A/anti-EMCV/GP não contém espaçador.

2. Acondicionamento e Títulos empregando-se combinações de GP e/ou Auxiliar de Capsídeo contendo IRES EMCV.

[0126] Várias combinações dos auxiliares de GP e

Capsídeo foram usadas para acondicionar um replicon expressando a proteína HIV-GAG, pERK-342/EMCV/gag (vide Exemplo 7 para uma descrição da construção deste replicon). Para os resultados apresentados na Tabela 13, 30 µg de cada auxiliar de RNA e 30 µg do RNA de replicon foram co-eletroporados dentro de células Vero em uma cubeta de eletroporação de 0,8 ml, utilizando-se 4 pulsos a 580 V e 25 µF, e as células foram permitidas recuperarem-se na temperatura ambiente por 10 min. Células eletroporadas foram semeadas dentro de frascos T-175, contendo 50 ml EMEM (10% FBS) com antibióticos e incubadas a 37 °C. Após 20 – 24 h, partículas de replicon VEE (“VRPs”) foram coletadas e tituladas em células Vero em placas de 96 poços, medindo-se a expressão da proteína GAG, usando-se um ensaio de imunofluorescência (IFA). A produção VRP (Tabela 13) de cada eletroporação é expressa em uma base de “IU/ml”, para fins comparativos.

Tabela 13

Auxiliar de Capsídeo	Auxiliar de GP	Rend. de VRPs (IU/ml)
pH500A/EMCV/Vcap 384	pH500A/EMCV/GP 393	1.6 e6
pH500A/EMCV/Vcap 291	pH500A/EMCV/GP 393	1.32 e6
pH1500A/EMCV/Vcap 167	pH500A/EMCV/GP 393	1.51 e6
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP 393	1.92 e5
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP #15	2.35 e5
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP #16	5.55 e5
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP #22	1.15 e6

pH500A/EMCV/Vcap 291	pH500A/EMCV/GP 291	2.22 e6
pH1500A/EMCV/Vcap 167	pH500A/EMCV/GP 291	5.16 e6
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP 291	1.75 e5
pH500A/EMCV/Vcap 291	pH500A/EMCV/GP	1.00 e7
pH1500A/EMCV/Vcap 167	pH500A/EMCV/GP	6.20 e7
pH500A/EMCV/Vcap 384	pH500A/EMCV/GP 376	2.99 e5
pH500A/EMCV/Vcap 291	pH500A/EMCV/GP 376	1.49 e5
pH1500A/EMCV/Vcap 167	pH500A/EMCV/GP 376	1.71 e5
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP 376	8.53 e4
pH500A/EMCV/Vcap 384	pH500A/EMCV/GP 342	8.11 e5
pH500A/EMCV/Vcap 291	pH500A/EMCV/GP 342	8.32 e5
pH1500A/EMCV/Vcap 167	pH500A/EMCV/GP 342	1.07 e6
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP 342	1.92 e5
pH500A/EMCV/Vcap 291	pH500A/GP	3.56 e8
		1.00 e8
pH1500A/EMCV/Vcap 167	pH500A/GP	1.13 e8
		2.37 e7

[0127] Em outros experimentos, a quantidade de RNA de auxiliar GP foi variada no ambiente de eletroporação; todas outras condições para produção VPR foram como descrito acima. Os resultados são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14

Auxiliar de Capsídeo	Auxiliar de GP	µg GP RNA	Rend. de VPR (IU/ml)
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP 393	45	1.51 e6
pH500A/Vcap	pH500A/EMCV/GP 393	60	2.24 e6

3. Auxiliares GP IRES-26S, sem Espaçador

[0128] Este experimento foi realizado para ver se um espaçador era necessário no Auxiliar GP, para desacoplar a transcrição da tradução. Células Vero foram separadamente eletroporadas com cada uma das

seguintes misturas:

a. Vetor de Replicon Gag (vide Ex. 6) + pH500A/anti-EMCV/GP + Ph500A/anti-EMCV/Vcap 291

b. Vetor Replicon Gag + pH500A/EMCV/GP + pH500A/EMCV/Vcap 291

[0129] As células foram incubadas como descrito anteriormente, pra permitir a produção VRP e os VRPs foram colhidos e titulados em células VERO por IFA. No caso dos auxiliares com o IRES na orientação de sentido (a mistura “b.”), a produção VRP foi de 3,3 e6; enquanto no caso dos auxiliares em que o IRES é colocado na orientação anti-sentido, a produção VRP era de 5,3 e2.

4. Produção e Uso de construções auxiliares VEE, contendo IRES XIAP

[0130] Os genes de capsídeo VEE (“VCap”) e glicoproteína (“VGP”) foram amplificados por PCR de pH500A/Vcap e pH500A/GP, respectivamente, utilizando-se PFU pol (Stratagene; LaJolla, CA) e iniciadores pra diante Cap5’F ou 13-87pr1 e iniciadores inversos 3-1.1pr1 (Tabela 2, vide Exemplo 1B). Os produtos PCR resultantes foram clonados dentro dos sítios EcoRV e SphI de pKS-rep2. Esta estratégia reconstitui o códon de início da proteína estrutural no início do tipo selvagem do gene XIAP. A sequência de proteína estrutural VEE de cada plasmídeo foi verificada por seqüenciamento de DNA automatizado e os plasmídeos resultantes foram usados para transcrição *in vitro*. O RNA foi purificado usando-se colunas RNeasy Qiagen e eletroporados dentro de células Vero para análise da expressão de proteína e acondicionamento. Todos os auxiliares expressaram capsídeo VEE ou glicoproteínas, como determinado por IFA e as titulações recuperadas para um replicon VEE, expressando a proteína GAG HIV, variaram de 1×10^5 a 1×10^7 total.

[0131] A construção de proteína estrutural VEE-XIAP1007, descrita acima foi também clonada em um segundo plasmídeo

auxiliar, pH1500A, como um fragmento de DNA ApaI/SphI, gerando pH1500A/XIAP/Vcap 1007 e pH1500A/XIAP/GP 1007. Estes plasmídeos foram usados para produzir RNA e eletroporados dentro de células Vero como acima, para analisar a expressão de proteína e acondicionamento VRP. Repetindo, os auxiliares resultantes expressaram o capsídeo VEE ou glicoproteína, como determinado por IFA, e as titulações variaram de 1×10^8 a acima de 1×10^9 VRP total, demonstrando o ganho da transcrição do mRNA subgenômico do promotor 26S.

Exemplo 5

[0132] Análise Northern foi realizada em RNA celular total, coletado de células Vero, dentro das quais RNAs de replicon foram eletroporadas. As construções de replicon Espaçador-IRES foram transcritas *in vitro* e 30 µg de RNA purificado por coluna RNeasy foram eletroporados dentro de aproximadamente 1×10^7 células Vero, como descrito acima. As células eletroporadas foram ressuspensas em 10 ml de meios DMEM, em seguida 7 ml (aproximadamente 7×10^6 células) foram semeadas dentro de um frasco de 25 cm². O RNA celular total foi coletado das células 16 h pós eletroporação, empregando-se kit de extração RNAwiz (Ambion), em seguida a instruções dos fabricantes. Os RNAs foram quantificados e 10 µg de cada foram passados em um gel de agarose de 1% glioxal antes de serem transferidos para uma membrana Brightstar-Plus (Ambion) por transferência passiva. Os RNAs foram reticulados por UV na membrana, bloqueados com solução UltraHyb (Ambion) por 1 h a 45 °C e sondados durante a noite com solução UltraHyb, contendo um iniciador anti-sentido biotilado (3' UTR4Xbiotina, Tabela 1) específico para 3' UTR do RNA subgenômico VEE (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) 45 °C. Após hibridização durante a noite, a mancha foi processada por detecção de RNA quimioluminescente, usando-se um kit Brightstar Biodetect (Ambion), em seguida a instruções dos fabricantes e visualização com um Epi Chemi II

Darkroom (UVP, Inc., Upland, CA). Os resultados da análise Northern do RNA das células Vero, eletroporadas com pERK/EMCV/CAT 257, pERK/anti-EMCV/CAT 257, pERK/EMCV/CAT 579 ou pERK/anti-EMCV/CAT 579 são mostrados na Figura 1. As construções de replicon tanto EMCV como anti-EMCV produziram transcrições subgenômicas de quase igual intensidade, indicando que a falta de expressão da proteína CAT das construções de replicon CAT/espaçador-anti-EMCV não era devida a qualquer redução substancial dos RNAs subgenômicos.

Exemplo 6. - Construção de um vetor de replicon dirigido-IRES gene HIV_{gag}

[0133] Um gene gag subtipo C HIV foi clonado dentro do vetor pERK/EMCV, contendo um espaçador de 342 pelícua base (pERK-342), como descrito acima. O gene gag foi amplificado por PCR de DNA pERK/HIV_{gag}, empregando-se iniciadores GAG-F e GAG-R (Tabela 1). Os iniciadores foram construídos para conter sítios de restrição BamHI, de modo que o produto PCR codificasse para este sítio nas terminações 5' e 3'. O produto PCR foi digerido com enzima de restrição BamHI e ligado dentro de DNA pCDNA3.3/EMCV linearizado BamHI. A orientação do gene gag foi determinada por análise de restrição e uma construção com o gene na orientação correta foi selecionada, gerando pCDNA3.3/EMCV/gag. O cassete de EMCV/gene gag foi digerido de DNA de pCDNA3.3/EMCV/gag com enzima de restrição AscI e ligado dentro de DNA pERK-342 linearizado AscI. Orientação do cassete de EMCV/gene gag foi determinada por análise de restrição e uma construção com o gene na orientação correta foi selecionada, gerando pERK-342/EMCV/gag. A sequência da região EMCV/gag foi verificada antes de mais experimentos serem iniciados.

[0134] Análise de expressão da proteína gag, por IFA e mancha do Ocidente, indicou que a proteína expressada sob a direção de IRES do replicon pERK-342/EMCV/gag é indistinguível da proteína expressa de um replicon pERK/HIV_{gag}, em que tanto a tradução como a transcrição são dirigidas

pelo promotor subgenômico VEE 26S. Além disso, o nível de expressão, conforme medido por titulação VRP, foi aumentado com o sistema dirigido-IRES, em comparação com o sistema dirigido-promotor 26S (Tabela 15).

Tabela 15. Comparação dos títulos VRP gerados com diferentes vetores de replicon

Vetor Replicon	Título VRP
pERK/HIV _{gag}	4,0 x 10 ⁸ IFU
pERK-342/EMC/gag	5,3 x 10 ⁸ IFU

Exemplo 7 – Imune respostas humorais e celulares em camundongos inoculados com partículas de replicon de HIV_{gag} dirigidas-IRES

[0135] Replicon de pERK/EMCV/gag 342 elicia respostas humorais e celulares robustas, quando animais são vacinados. Camundongos BALB/c fêmeas com quatro a cinco semanas de idade, foram obtidos de Charles River e foram aclimatizados por uma semana antes de qualquer procedimento. Para começo e reforço, grupos de camundongos foram inoculados em ambas as plantas de pé sob anestesia de isoflurano, com uma dose alvo de 5 x 10⁵ IFU de VRP em PBS contendo diluente com 1% v/v de albumina de soro humano e 5% p/v de sacarose. Injeções nas plantas de pé foram realizadas com uma agulha 30,5 G e uma seringa Hamilton 0,100 ml, injetando-se 20 µl em cada planta de pé traseira. Amostras de soro foram obtidas por sangramento retro-orbital sob anestesia com isoflurano, antes de a primeira inoculação no Dia 0 (pré-sangramento), Dia 21 (20 dias após inoculação primária) e Dia 29 (7 dias após o reforço). O programa de vacinação é resumido na Tabela 16. Os baços foram colhidos 14 dias pós reforço para ensaios ELISPOT IFN-γ.

Tabela 16. Programa de vacinação VRP de replicon dirigido por IRES

Grupo	N	Cepa de camundongo	Vacina VPR	Dose, IFU	Via	Dia de inoculação	Dia de amostragem de soro
1	5	BALB/c	EMCV/Gag 342 ²	5 x 10 ⁵	sc-fp ⁴	Dias 1 & 22	Dias 0, 21, 29
2	5	BALB/c	EMCV/Gag 342 ²	5 x 10 ⁵	sc-fp ⁴	Dias 1 & 22	Dias 0, 21, 29

3	5	BALB/c	VPR ³ contr.	5 x 10 ⁵	sc-fp ⁴	Dias 1 & 22	Dias 0, 21, 29
---	---	--------	-------------------------	---------------------	--------------------	-------------	----------------

1: VPR Gag manufaturado GMP, preparado com vetor replicon pERK não modificado

2: 342 refere-se ao número de nucleotídeos do espaçador, a montante do cassette IRES/Gag.

3: Controle VPR consiste de replicons expressando um gene Nef/Pol HIV.

4: sc-fp refere-se a planta de pé subcutânea.

A. Ensaios imunológicos, realizados após vacinação

[0136] ELISA Gag: Histidina recombinante purificada-rotulada (his)-p55 de isolado de HIV-1 subtipo C DU-422 foi usada como cobertura de antígeno. Os soros foram avaliados quanto à presença de anticorpos específicos-Gag por um ELISA indireto padrão.

[0137] Ensaio ELISPOT Gag: Linfócitos viáveis, colhidos de baços, foram semeados dentro de poços de ensaio ELISPOT de uma placa Multiscreen Immobilon-P ELISPOT (placa de filtragem de 96-poços certificada ELISPOT, Millipore, Bedford, MA), que tinha sido pré-revestida com um anticorpo monoclonal anti-IFN- γ AN18 (IgG1 de rato, MabTech, Mariemont, OH) e incubada por 16 – 20 h. As células foram removidas por múltiplas lavagens com tampão e os poços foram incubados com um anticorpo monoclonal anti-IFN- γ biotilado R4-6A2 (IgG1 de rato, MabTech), seguido por lavagem e incubação com Complexo-Avidina-Peroxidase (Kit Vectastain ABC Peroxidase, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Para permitir que o complexo se formasse, o Complexo de Avidina-Peroxidase foi preparado pelo menos 30 minutos antes do término do período de incubação com o anticorpo secundário e foi armazenado em temperatura ambiente. Em seguida à incubação, os poços foram lavados e incubados por 4 minutos em temperatura ambiente com substrato (tabletes AEC, Sigma), para facilitar a formação de manchas que representam as posições das células de secreção-IFN- γ durante a cultura. O desenvolvimento da mancha foi parado por enxágüe com água destilada.

[0138] Para enumerar as células de secreção IFN- γ específicas-Gag dos linfócitos de camundongos imunizados com VPR HIV_{gag}, os linfócitos foram estimulados com o peptídeo imunodominante GAG-HIV

restringido-CD8+ CTL H-2K^d AMQMLKETI ou um peptídeo restringido-CD8+ CTL H-2K^d de HA (hemaglutinina de influenza) irrelevante IYSTVASSL, que se liga a MHC Classe I por 16 – 20 h (5% CO₂ a 37 °C). Células menos peptídeo servem como um controle de fundo. Como um controle positivo, as células foram estimuladas com 4 µg/ml de Conconavalina A, por um período de tempo similar. Os peptídeos foram sintetizados com extremidades livres e purificados a > 90% por New England Peptide.

[0139] Titulação de Potência HIV_{gag} VPR: células Vero infectadas IFA específico-Gag de HIV_{gag} VPR foram usadas para medir a potência o título infeccioso das vacinas. A potência é medida como unidades infecciosas por ml, IFU/ml. No dia de cada injeção, inóculos residuais foram retro-titulados, para determinar a dose real que cada animal recebia (Tabela 17).

Tabela 17. Resumo de resultados de ELISA e ELISPOT Gag

# do Camund.	Vacina HIV VPR	Dose de Inoculações (IFU)		Títulos Ab Gag			ELISPOT ¹ (SFC/1 e 6 linfócitos) 14 dias pós-reforço Dia 36
		Inicial Dia 1	Reforço Dia 22	Pré-sangria Dia 1	7 dias pós-reforço Dia 29	GMT ²	
1-1	EMCV/ gag 342	6,8 e 5	4,4 e 5	<40	20480	23525	341
1-2				<40	40960		
1-3				<40	20480		
1-4				<40	20480		
1-5				<40	20480		
2-1	EMCV/ gag 342	1,2 e 6	5,6 e 5	<40	5120	13512	438
2-2				<40	10240		
2-3				<40	10240		
2-4				<40	20480		
2-5				<40	40960		
3-1	VPR controle	2,8 e 5	2,2 e 5	<40	<40		7
3-2				<40	<40		
3-3				<40	<40		
3-4				<40	≥40 (OD=0,32)		
3-5				<40	≥40 (OD=0,32)		

- 1: Linfócitos SFC/1e6 refere-se a células formadoras de mancha por 1×10^6 linfócitos
2: GMT, titulação média geométrica

[0140] Os resultados do estudo de vacinação indicam que os animais vacinados 342/EMCV/gag VRP montaram uma imune resposta humoral e celular robusta para HIV-Gag, conforme medido por ensaios ELISA anticorpo anti-Gag e ELISPOT específico Gag.

Exemplo 8

[0141] A atividade de diversas sequências IRES de vírus de inseto foi comparada com a atividade de um IRES de vírus-mamífero (EMCV) em numerosas linhagens de célula de inseto. Vetores de replicon foram designados, de modo que o transcrito subgenômico 26S fosse bicistrônico. O RNA subgenômico 26s é coberto, significando que a tradução do primeiro gene no RN bi-cistrônico (Cloramfenicol acetil transferase (CAT)) é dependente de cobertura, enquanto a tradução do segundo gene (luciferase (LUC)) é dependente da sequência IRES (independente de cobertura). Vetores de replicon baseados em vírus Sindbis foram construídos para conter os seguintes elementos: 5'NCR, nsp1, 2, 3, 4, promotor 26S, gene CAT, IRES, gene LUC, NCR 3'. Duas sequências IRES de vírus de inseto, uma derivada de vírus *Acyrtosiphon pisum* (APV) e outra de vírus *Rhopalosiphum padi* (RhPV), foram construídas entre os genes CAT e LUC. Para comparação, um IRES de vírus de mamífero (EMCV) foi construído entre os genes CAT e LUC dentro do mesmo vetor de replicon Sindbis. RNA para cada construção de replicon e um auxiliar de RNA, que codificaram para todos os genes de proteína estrutural Sindbis (capsídeo-E3-E2-6K-E1) foram transcritos *in vitro*, utilizando-se polimerase de RNA SP6. Partículas de replicon Sindbis foram preparadas por eletroporação de RNA de auxiliar e cada um dos RNAs de replicon bi-cistrônico dentro de 8×10^6 células BHK. Os meios foram coletados, purificados e as partículas de replicon foram purificadas por centrifugação, através de uma almofada de 20% de sacarose (24000 RPM por 3 h a 4 °C). Partículas de replicon foram tituladas utilizando-

se um anticorpo anti-CAT de coelho (Cortex Biochem, San Leandro, CA).

[0142] Para determinar a atividade das sequências IRES de vírus de inseto, em comparação com IRES EMCV, as partículas bi-cistrônicas de replicon Sindbis purificadas foram usadas para infectar numerosas diferentes células de inseto desenvolvendo-se em cultura. As células de inseto usadas nestes experimentos foram: *Toxorhynchitesamboinensis*, *Anophelesalbimanus*, *Anophelesgambiae* e *AedesAlbopictus*. As células de inseto foram infectadas em MOI de 0,1 com partículas bi-cistrônicas de replicon. Aproximadamente 16 h pós infecção, lisados de células foram preparados e a quantidade de proteína CAT presente nos lisados foi determinada utilizando-se um kit CAT ELISA (Roche, Indianapolis, IN), seguindo-se as instruções dos fabricantes. Em paralelo, a quantidade de proteína LUC presente nos lisados foi determinada utilizando-se um kit de ensaio de luciferase (Roche). A quantidade de CAT e LUC detectada em cada lisado foi normalizada para a quantidade de proteína usada em cada ensaio, para permitir comparação dos dois valores (Tabela 17). A proteína CAT detectada em cada tipo de célula era similar, independente do replicon usado. Estes dados indicam que eficiências de infecção similares foram obtidas dentro de um tipo de célula para cada uma das três partículas de replicon contendo IRES e, assim, a atividade LUC detectada em cada tipo de célula reflete diretamente a atividade da sequência IRES naquele tipo de célula. Em cada um dos tipos de célula de inseto analisados, IRES de vírus de inseto tinha mais atividade (85 – 95% mais) do que IRES EMCV (Tabela 17).

Tabela 17. Comparação de atividade de IRES de vírus-inseto (APV ou RhPV) e atividade IRES de vírus de mamífero (EMCV) em diferentes tipos de célula de inseto.

Tipo de célula de inseto	IRES analisado	ng CAT/ug proteína	Atividade LUC (RLU)/ug proteína	% de Diferença de EMCV
<i>Tox.amboinensis</i>	APV	2.0	290.5	00%
<i>Tox.amboinensis</i>	RhPV	2.1	231.4	85%
<i>Tox.amboinensis</i>	EMCV	1.6	33.1	0%
<i>An. Albimanus</i>	APV	2.9	497.7	93%
<i>An. Albimanus</i>	RhPV	2.0	468.6	93%
<i>An. Albimanus</i>	EMCV	2.3	31.8	0%
<i>An. gambiae</i>	APV	1.8	525.7	95%
<i>An. gambiae</i>	RhPV	1.7	283.6	91%
<i>An. gambiae</i>	EMCV	1.8	24.2	0%
<i>Ae. albopictus</i>	APV	4.8	87.3	93%
<i>Ae. albopictus</i>	RhPV	4.1	119	95%
<i>Ae. albopictus</i>	EMCV	4.7	5.7	0%

Exemplo 9. Respostas imunes humorais e celulares a um replicon de IRES em primatas

[0143] Um estudo sobre a imunogenicidade de VRPs contendo pERK/EMCV/gag 342 (Exemplo 6) foi também conduzido em macacos cynomolgus no Southern Research Institute in Frederick, MD. Cada vacina foi administrada a seis animais por injeção subcutânea e intramuscular (três animais/via). Os animais receberam duas inoculações de 1×10^8 partículas de vacina a 0 e 1 mês. Respostas imunes humorais foram analisadas 4-semanas após a segunda inoculação (como descrito no Exemplo 7A) e são apresentados na Tabela 18. Para comparação, um replicon VEE, expressando a proteína gag diretamente do promotor 26S (pERK/gag), foi também avaliado.

Tabela 18

Construção	Via	GMT ELISA
pERK/EMCV/gag 342	Subcutânea	1613
pERK/EMCV/gag 342	Intramuscular	640
pERK/gag	Subcutânea	403
pERK/gag	Intramuscular	1280

[0144] Embora o presente processo tenha sido descrito com referência a detalhes específicos de certas de suas formas de realização, não se pretende que tais detalhes sejam considerados como limitações do escopo

da invenção, exceto que e na extensão de que eles sejam incluídos nas reivindicações anexas.

[0145] Por todo este pedido, várias patentes, publicação de patente, publicações de jornal e outras publicações sejam referenciadas. As descrições destas publicações em sua totalidade são incorporadas por referência neste pedido, a fim de mais totalmente descrever o estado da técnica a que esta invenção pertence e prover descrição escrita para o assunto da frase em que estas referências aparecem neste pedido.

REIVINDICAÇÕES

1. Ácido nucleico de replicon recombinante, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma sequência de ácido nucleico, codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5’;

(b) uma sequência de ácido nucleico, codificando uma proteína não-estrutural de alfa-vírus;

(c) um cassete de promotor subgenômico de alfa-vírus-IRES-ácido nucleico de interesse (NOI) heterólogo, que está na orientação 5’ para 3’; e

(d) um ácido nucleico, codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3’.

2. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o cassete de promotor subgenômico de alfa-vírus-IRES-NOI heterólogo compreende ainda uma sequência de ácido nucleico de espaçador, localizada 3’ do promotor subgenômico de alfa-vírus e 5’ do IRES.

3. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato da sequência de ácido nucleico de (b) ser uma sequência de nucleotídeo contígua, codificando proteínas não estruturais de alfa-vírus nsp1, nsp2, nsp3 e nsp4.

4. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato da sequência de ácido nucleico de (b) ser uma sequência de nucleotídeo contígua, codificando proteínas não estruturais de alfa-vírus nsp1, nsp2 e nsp3 e em que o ácido nucleico de replicon recombinante compreende ainda uma sequência de nucleotídeo codificando ainda uma proteína não estrutural de alfa-vírus nsp4 que não é contígua com a sequência de ácido nucleico de (b).

5. Ácido nucleico de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato do IRES ser selecionado do grupo consistindo de IRESs celulares, IRESs de planta, IRESS de vírus de mamífero, IRESs sintéticos e IRESs de vírus de inseto.

6. Ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato do promotor subgenômico de alfa-vírus de (c) ser um promotor subgenômico de alfa-vírus mínimo ou modificado.

7. Ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato do NOI heterólogo de (c) codificar uma proteína ou peptídeo.

8. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato do peptídeo ser um imunógeno.

9. Ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato do NOI heterólogo de (c) ser uma sequência anti-sentido.

10. Ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato do NOI heterólogo de (c) codificar uma ribozima.

11. Ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma sequência de nucleotídeo codificando uma proteína estrutural de alfavírus.

12. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato da proteína estrutural de alfa-vírus ser de um alfa-vírus selecionado do grupo consistindo de vírus Sindbis, vírus SFV, VEE, S.A. AR86, vírus Ross River, EEE e WEE.

13. Ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato da sequência de ácido nucleico de (a) ser de um alfa-vírus selecionado do grupo consistindo de vírus Sindbis, vírus SFV, VEE, S.A. AR86, vírus Ross River, EEE e WEE.

14. Ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato a sequência de ácido nucleico de (b) ser de um alfa-vírus selecionado do grupo consistindo de vírus Sindbis, vírus SFV, VEE, S.A. AR86, vírus Ross River, EEE e WEE.

15. Ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato do promotor subgenômico de alfa-vírus de (c) ser de um alfa-vírus selecionado do grupo consistindo de vírus Sindbis, vírus SFV, VEE, S.A. AR86, vírus Ross River, EEE e WEE.

16. Ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato do ácido nucleico de (d) ser de um alfa-vírus selecionado do grupo consistindo de vírus Sindbis, vírus SFV, VEE, S.A. AR86, vírus Ross River, EEE e WEE.

17. Ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato do ácido nucleico ser RNA.

18. Ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato do ácido nucleico ser DNA.

19. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato da sequência de ácido nucleico de espaçador não codificante ter o comprimento de pelo menos 30 nucleotídeos.

20. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato da sequência de ácido nucleico de espaçador não codificador ter o comprimento entre 25 e 7500 nucleotídeos.

21. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato da sequência de ácido nucleico de espaçador não codificante ter o comprimento entre 25 e 1000 nucleotídeos.

22. Ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que compreende uma mutação de atenuação.

23. Ácido nucleico de replicon recombinante, caracterizado

pelo fato de compreender:

(a) uma sequência de ácido nucleico, codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5’;

(b) uma sequência de ácido nucleico, codificando uma proteína não-estrutural de alfa-vírus;

(c) um primeiro cassete de promotor subgenômico de alfa-vírus-IRES-NOI heterólogo, que está na orientação 5’ para 3’;

(d) um segundo cassete de promotor subgenômico de alfa-vírus-IRES-NOI heterólogo, que está na orientação 5’ para 3’; e

(e) um ácido nucleico, codificando uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3’.

24. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o primeiro e segundo cassetes de promotor subgenômico de alfa-vírus-IRES-NOI heterólogo compreendem ainda uma sequência de ácido nucleico de espaçador não codificante, localizada 3’ do promotor subgenômico de alfa-vírus e 5’ do IRES.

25. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 23 e 24, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um sinal de empacotamento de alfa-vírus.

26. População de partículas de alfa-vírus infecciosas e defeituosas, caracterizada pelo fato de cada partícula compreender o ácido nucleico como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25.

27. População de partículas de alfa-vírus infecciosas e defeituosas de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato da população não ter vírus de replicação competente detectável, conforme medido por passagem em cultura de célula.

28. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender a população como definida na reivindicação 26 ou 27, em um veículo farmacêuticamente aceitável.

29. Partícula de alfa-vírus, caracterizada pelo fato de compreender um ácido nucleico recombinante como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25.

30. Partícula de alfa-vírus de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de compreender uma mutação atenuante.

31. Ácido nucleico de replicon recombinante, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5’;

(b) um cassete de promotor subgenômico de alfa-vírus-IRES-NOI heterólogo, que está na orientação 5’ para 3’, em que a sequência NOI codifica uma ou mais proteínas estruturais de alfa-vírus; e

(c) uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3’.

32. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que os cassetes de promotor subgenômico de alfa-vírus-IRES-NOI heterólogo compreendem ainda uma sequência de ácido nucleico de espaçador não codificante, localizada 3’ do promotor subgenômico de alfa-vírus e 5’ do IRES.

33. Célula microbiana, caracterizada pelo fato de compreender o ácido nucleico como definido na reivindicação 31 ou 32.

34. Ácido nucleico de acordo com a reivindicação 1 e 2, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um sinal de empacotamento de alfa-vírus.

35. Método in vitro para produzir partículas de alfa-vírus infecciosas e defeituosas, caracterizado pelo fato de compreender:

a) introduzir dentro de uma célula o seguinte:

(i) um ácido nucleico recombinante como definido na reivindicação 1 ou 2, e

(ii) um ou mais ácidos nucleicos auxiliares, codificando proteínas estruturais de alfa-vírus, em que o um ou mais ácidos nucleicos auxiliares produzem todas as proteínas estruturais de alfa-vírus, e

b) produzir ditas partículas de alfa-vírus na célula.

36. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato do ácido nucleico recombinante de replicon compreender ainda uma sequência de nucleotídeo codificando uma proteína estrutural de alfa-vírus.

37. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato do ácido nucleico auxiliar ser um ácido nucleico recombinante, compreendendo uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5', um promotor subgenômico de alfa-vírus, um ácido nucleico codificando uma proteína estrutural de alfa-vírus e uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3'.

38. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato do ácido nucleico auxiliar ser um ácido nucleico recombinante, compreendendo um promotor e sequências de nucleotídeo, codificando uma ou mais proteínas estruturais de alfa-vírus.

39. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato do ácido nucleico auxiliar ser DNA.

40. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato do promotor ser um promotor CMV.

41. Método de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato do ácido nucleico auxiliar compreender sequências de nucleotídeo codificando todas as proteínas estruturais de alfa-vírus.

42. Método de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato do ácido nucleico auxiliar ser um ácido nucleico recombinante, compreendendo uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5', um elemento IRES, um ácido nucleico codificando uma proteína estrutural de alfa-vírus e uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus

3'.

43. Método in vitro para produzir partículas de alfa-vírus infecciosas e defeituosas, caracterizado pelo fato de compreender:

a) introduzir dentro de uma célula o seguinte:

i) um RNA de replicon de alfa-vírus, compreendendo uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 5', sequência(s) de ácido nucleico codificando proteínas não estruturais de alfa-vírus, um promotor subgenômico de alfa-vírus, uma sequência de ácido nucleico heteróloga e uma sequência de reconhecimento de replicação de alfa-vírus 3'; e

ii) um ou mais ácidos nucleicos auxiliares, codificando proteínas estruturais de alfa-vírus, compreendendo ácido nucleico recombinante de acordo com a reivindicação 31 ou 32, por meio do que todas as proteínas estruturais de alfa-vírus são produzidas na célula; e

b) produzir ditas partículas de alfa-vírus na célula.

44. Método in vitro para produzir partículas de alfa-vírus infecciosas e defeituosas, caracterizado pelo fato de compreender:

a) introduzir dentro de uma célula o seguinte:

i) um ácido nucleico recombinante de replicon de como definido na reivindicação 1 ou 2; e

ii) um ou mais ácidos nucleicos auxiliares, codificando proteínas estruturais de alfa-vírus, compreendendo um ácido nucleico recombinante como definido na reivindicação 31 ou 32, por meio do que todas as proteínas estruturais de alfa-vírus são produzidas na célula; e

b) produzir ditas partículas de alfa-vírus na célula.

45. Partículas de alfa-vírus infecciosas e defeituosas, caracterizadas pelo fato de serem produzidas pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 35 a 42 ou 44.

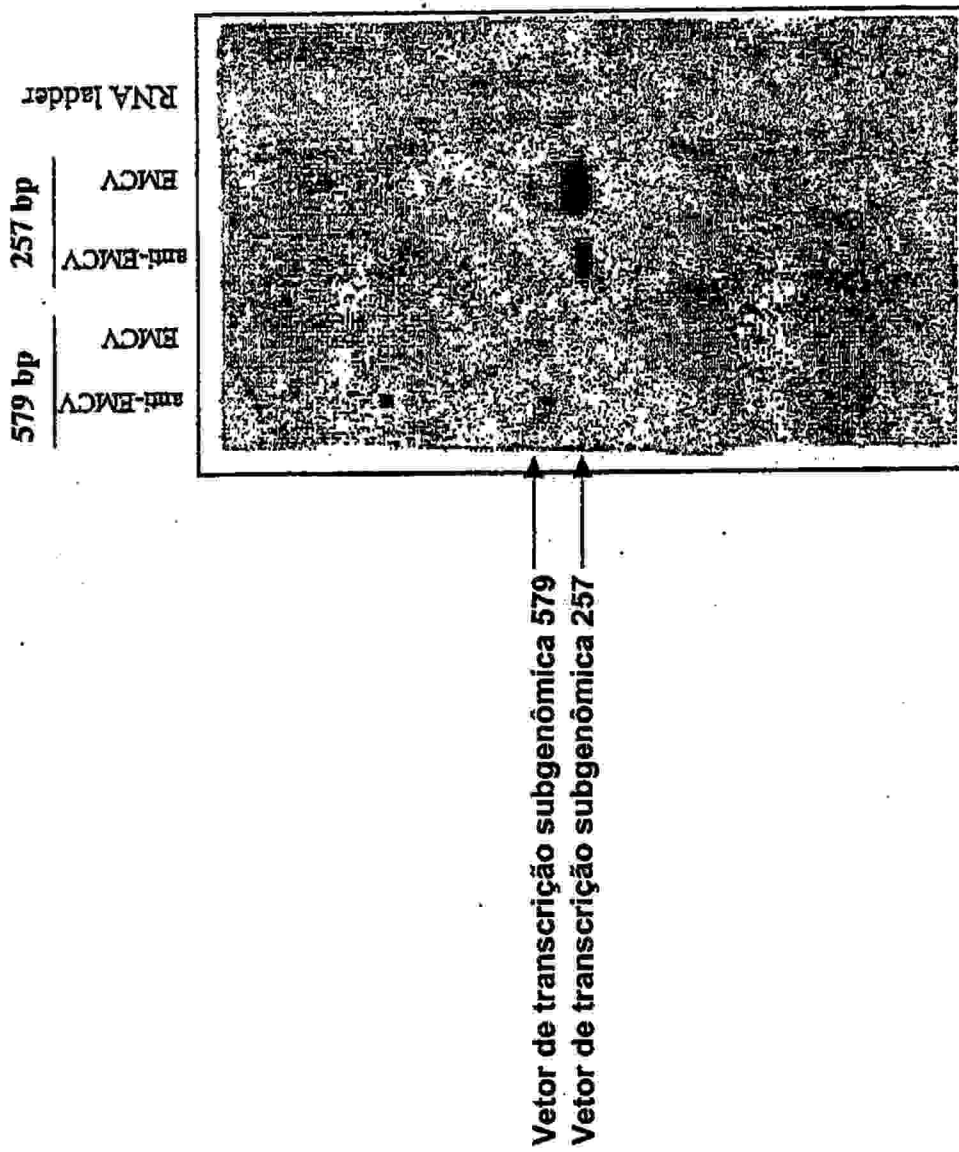


Figura 1: Análise Northern de RNAs subgenômicos de replicon de espaçador-IRES