



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 312 447**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/86** (2006.01)  
**C07K 1/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01941874 .8**  
96 Fecha de presentación : **31.05.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1285080**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.02.2003**

54 Título: **Procedimiento para la purificación de partículas de replicón del alfavirus.**

30 Prioridad: **31.05.2000 US 208376 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.03.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2009**

73 Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**  
**4560 Horton Street**  
**Emeryville, California 94608, US**

72 Inventor/es: **Polo, John, M.;**  
**Greer, Catherine;**  
**Calderon-Cacia, Maria;**  
**Del La Vega, Daniel, Jr. y**  
**Dubensky, Thomas, W., Jr.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 312 447 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la purificación de partículas de replicón del alfavirus.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere en general a la cuantificación de las preparaciones de vectores de replicón.

**Antecedentes de la invención**

10 Los alfavirus comprenden una serie de virus genéticamente, estructuralmente y serológicamente relacionados de la familia *Togaviridae* que se transmiten a través de artrópodos. Se han clasificado veintiséis virus y subtipos de virus conocidos dentro del género alfavirus, que incluyen, el virus Sindbis, el virus de Semliki Forest, el virus de Ross River y el virus de la encefalitis equina venezolana.

15 El virus Sindbis es el miembro prototipo del género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae*. Su estrategia de replicación se ha caracterizado muy bien en una diversidad de cultivos celulares y sirve como un modelo bien aceptado para otros alfavirus. Brevemente, el genoma del virus Sindbis (al igual que otros alfavirus) es una molécula de ARN con polaridad positiva de hebra única de aproximadamente 12 kb que tiene caperuza y está poliadenilada, y contenida  
20 con polaridad positiva de hebra única de aproximadamente 12 kb que tiene caperuza y está poliadenilada, y contenida dentro de una cápside de proteínas codificada por el virus. La nucleocápside está rodeada además por una envoltura lipídica derivada del huésped dentro de la que dos glicoproteínas específicas del virus, E1 y E2, están insertadas y ancladas a la nucleocápside. Ciertos alfavirus (por ejemplo, SFV) también mantienen una proteína adicional, E3, que es un producto de escisión de la proteína precursora de E2, PE2.

25 Tras la adsorción de la partícula viral a las células diana, la penetración y la eliminación de la nucleocápside para liberar el ARN genómico viral en el citoplasma, el proceso de replicación tiene lugar a través de cuatro proteínas no estructurales del alfavirus (nsPs), traducidas a partir de los dos tercios 5' del genoma viral. La síntesis de un ARN de polaridad negativa de longitud total proporciona, a su vez, el molde para la síntesis de otra hebra de ARN genómico positiva y un ARN subgenómico 26S expresado de manera abundante, que se inicia internamente en el promotor de  
30 la región de unión. Las proteínas estructurales del alfavirus (sPs) se traducen a partir del ARN subgenómico 26S, que representa el tercio 3' del genoma, y como las nsPs, se procesan de manera postraduccional en las proteínas individuales.

35 Se están desarrollando varios miembros del género alfavirus como vectores de expresión de "replicón" para uso como vacunas y agentes terapéuticos. Los vectores de replicones pueden usarse en varios formatos, incluidos partículas de vectores de ADN, ARN y recombinantes. Tales vectores de replicones se han obtenido a partir de alfavirus que incluyen, por ejemplo, el virus Sindbis (Xiong y col., *Science* 243:1188-1191, 1989; Dubensky y col., *J. Virol.* 70:508-519, 1996; Hariharan y col., *J. Virol.* 72:950-958, 1988; Polo y col., *PNAS* 96:4598-4603, 1999), el virus de Semliki Forest (Liljestrom, *Bio/Technology* 9:1356-1361, 1991; Berglund y col., *Nat. Biotech.* 16:562-565, 1998), y el virus de la encefalitis equina venezolana (Pushko y col., *Virology* 239:389-401, 1997). Una gran cantidad de bibliografía ha  
40 demostrado ahora la eficacia de tales vectores de replicones para aplicaciones tales como vacunas (véase por ejemplo, Dubensky y col., *ibid*; Berglund y col., *ibid*; Hariharan y col., *ibid*; Pushko y col., *ibid*; Polo y col., *ibid*; Davis y col., *J. Virol.* 74:371-378, 2000; Schlesinger y Dubensky, *Curr Opin. Biotechnol.* 10: 434-439, 1999; Berglund y col., *Vaccine* 17:497-507, 1999).

45 Por su configuración, los replicones de vectores no expresan las proteínas estructurales del alfavirus necesarias para el empaquetamiento en partículas de alfavirus recombinantes (partículas de replicones). Por consiguiente, para generar partículas de replicones, estas proteínas deben proporcionarse en trans. El empaquetamiento puede llevarse a cabo por medio de una diversidad de procedimientos, incluidos enfoques transitorios tales como la cotransfección de replicones transcritos y ARN(s) auxiliar incompleto *in vitro* (Liljestrom, *Bio/Technology* 9:1356-1361, 1991; Bredenbeek y col., *J. Virol.* 67: 6439-6446, 1993; Frolov y col., *J. Virol.* 71: 2819-2829, 1997; Pushko y col., *Virology* 239: 389-401, 1997; Patentes de EEUU N° 5.789.245 y 5.842.723) o replicones basados en ADN de plásmidos y construcciones auxiliares incompletas (Dubensky y col., *J. Virol.* 70:508-519, 1996), así como la introducción de replicones del  
50 alfavirus en líneas celulares de empaquetamiento (PCL) estables (Polo y col., *PNAS* 96: 4598-4603, 1999; Patentes de EEUU N° 5.789.245, 5.842.723 y 6.015.694; publicaciones PCT WO 9738087 y WO 9918226).

Las partículas de replicones del alfavirus producidas usando cualquiera de los procedimientos anteriores se recogen posteriormente en los sobrenadantes del cultivo celular. Las partículas de replicones pueden a continuación concentrarse y purificarse parcialmente usando uno de los varios enfoques publicados, incluidos la precipitación con polietilenglicol (PEG), ultracentrifugación, o cromatografía de intercambio iónico en sulfato de Cellufine™. Desafortunadamente, estos procedimientos no eliminan un nivel suficiente de contaminantes proteicos no derivados del  
60 alfavirus, no pueden realizarse a gran escala, o son costosos y por consiguiente probablemente no son razonables para la fabricación comercial necesaria para vacunas y productos terapéuticos.

65 La presente invención proporciona procedimientos para cuantificar partículas de vectores en una preparación. Las partículas de alfavirus caracterizadas según los procedimientos descritos en este documento pueden usarse para una diversidad de aplicaciones, incluidas por ejemplo, vacunas y terapia génica.

**Resumen de la invención**

Brevemente, la presente invención proporciona procedimientos para cuantificar partículas de replicones del alfavirus. Tales partículas de replicones pueden obtenerse a partir de una gran diversidad de alfavirus (por ejemplo, el virus de Semliki Forest, el virus de Ross River, el virus de la encefalitis equina venezolana, el virus Sindbis) y se diseñan para expresar una diversidad de proteínas heterólogas (por ejemplo, antígenos, proteínas inmunoestimuladoras, proteínas terapéuticas).

Un procedimiento para purificar partículas de replicones del alfavirus se obtiene poniendo en primer lugar una preparación que contiene las partículas de replicones del alfavirus en contacto con una resina de intercambio iónico, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para unirse a la resina. A continuación, se elimina de la resina de intercambio iónico la porción de la preparación que no está unida a la resina de intercambio iónico, y a continuación se eluyen y se recuperan las partículas de replicones del alfavirus unidas de la resina de intercambio iónico. La resina de intercambio iónico puede ser una resina de intercambio iónico de tipo tentacular. Esta puede ser una resina de intercambio catiónico o una resina de intercambio aniónico.

Un procedimiento para la purificación de partículas de replicones del alfavirus puede comprender al menos dos etapas de purificación por cromatografía. Las etapas de purificación por cromatografía se seleccionan del grupo constituido por cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de afinidad. La purificación puede realizarse usando una primera etapa de cromatografía de intercambio iónico y una segunda etapa de cromatografía de exclusión por tamaño.

Un procedimiento para producir partículas de replicones del alfavirus incluye infectar células empaquetadoras del alfavirus con una población de siembra de partículas de replicones del alfavirus y a continuación incubar en un biorreactor bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la producción de partículas de replicones del alfavirus. A continuación se recogen los sobrenadantes de los cultivos que contienen las partículas de replicones. El biorreactor puede ser un biorreactor de componente externo o un biorreactor de cultivo en suspensión.

Un procedimiento para producir partículas de replicones del alfavirus incluye transfectar células empaquetadoras del alfavirus con un replicón del alfavirus basado en ADN o un sistema eucariota de iniciación de vectores en capas y a continuación incubar en un biorreactor, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la producción de partículas de replicones del alfavirus. A continuación se recogen los sobrenadantes de los cultivos que contienen las partículas de replicones.

Un procedimiento para producir partículas de replicones del alfavirus incluye transfectar células empaquetadoras del alfavirus con un replicón de un vector de ARN del alfavirus transcrito *in vitro* y a continuación incubar en un biorreactor, bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la producción de partículas de replicones del alfavirus. A continuación se recogen los sobrenadantes de los cultivos que contienen las partículas de replicones.

Los procedimientos para generar partículas de replicones del alfavirus para uso en vacunas o aplicaciones terapéuticas incluyen la producción de partículas de replicones en líneas celulares de empaquetamiento y la purificación por un procedimiento de purificación cromatográfico como se describió anteriormente. El procedimiento de purificación por cromatografía puede incluir una etapa de cromatografía de intercambio iónico usando una resina de intercambio iónico de tipo tentacular.

Una preparación de partículas de replicones del alfavirus puede purificarse por medio de un procedimiento de purificación cromatográfico como se describió anteriormente. El procedimiento de purificación por cromatografía puede incluir una etapa de cromatografía de intercambio iónico usando una resina de intercambio iónico de tipo tentacular.

Una vacuna o composición inmunogénica puede comprender una preparación de partículas de replicones de alfavirus purificada por un procedimiento de purificación por cromatografía como se describió anteriormente. Siendo la preparación de partículas de replicones capaz de expresar un antígeno derivado de un agente patógeno. El procedimiento de purificación por cromatografía puede incluir una etapa de cromatografía de intercambio iónico usando una resina de intercambio iónico de tipo tentacular. El antígeno puede derivar de una célula tumoral o de un agente infeccioso (por ejemplo, virus, bacterias, hongos y parásitos) tales como del VIH (por ejemplo, gaga, gp120, gp140, gp160, pol, rev, tat y nef) o del VHC (por ejemplo C, E1, E2, NS3, NS4, y NS5).

Los procedimientos para estimular una respuesta inmune dentro de un animal de sangre caliente pueden comprender la etapa de administrar al animal de sangre caliente una preparación de partículas de replicones del alfavirus purificadas por un procedimiento de purificación cromatográfico según se describió anteriormente siendo la preparación de partículas de replicones capaz de expresar un antígeno derivado de un agente patógeno. El procedimiento de purificación por cromatografía puede incluir una etapa de cromatografía de intercambio iónico usando una resina de intercambio iónico de tipo tentacular. El antígeno puede derivar de una célula tumoral o de un agente infeccioso (por ejemplo, virus, bacterias, hongos y parásitos) tales como del VIH o del VHC.

## ES 2 312 447 T3

Los procedimientos para estimular una respuesta inmune dentro de un animal de sangre caliente pueden comprender la etapa de administrar al animal de sangre caliente una preparación de partículas de replicones del alfavirus purificada por un procedimiento de purificación cromatográfico según se describió anteriormente siendo la preparación de partículas de replicones capaz de expresar una linfocina, citocina o quimiocina. El procedimiento de purificación por cromatografía puede incluir una etapa de cromatografía de intercambio iónico usando una resina de intercambio iónico de tipo tentacular. La linfocina, citocina o quimiocina puede seleccionarse del grupo constituido por IL-2, IL-10, IL-12, interferón gamma, GM-CSF, MIP3 $\alpha$ , MIP3 $\beta$  y SLC.

Las técnicas usadas para establecer la seguridad y potencia de preparación de partículas de vectores incluyen que la preparación esté libre de partículas alfavirales contaminantes capaces de replicarse. Las líneas celulares de empaquetamiento usadas para producir las partículas de vectores contienen al menos tres fuentes de ácidos nucleicos separadas usadas para producir las partículas de vectores. Una fuente de ácido nucleico contiene proteínas virales no estructurales y un gen de interés, otra contiene genes que codifican proteínas estructurales y una tercera codifica proteínas estructurales que no están presentes en ninguna otra fuente de ácido nucleico, por consiguiente, sólo pueden surgir partículas alfavirales contaminantes capaces de replicarse si se produce un mínimo de dos acontecimientos de recombinación.

Una preparación de partículas de replicones libres de partículas alfavirales contaminantes capaces de replicarse detectables puede asegurarse usando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en las que se proporciona un sustrato de ácido nucleico adecuado para detectar múltiples acontecimientos de recombinación. El sustrato deriva de una población de partículas de replicones de alfavirus y el sustrato de ácido nucleico se hace reaccionar con al menos una primera mezcla de reacción que comprende un oligonucleótido complementario de un gen de proteína no estructural del alfavirus y un oligonucleótido complementario de un gen de proteína estructural del alfavirus. El gen de proteína estructural es un gen de proteína de cápside o un gen de proteína estructural que no pertenece a la cápside. Para permitir la amplificación del sustrato de ácido nucleico y la formación de un primer producto de reacción se proporcionan las condiciones de reacción y el tiempo adecuados. A continuación, se hace reaccionar el primer producto de reacción con una segunda mezcla de reacción que contiene un oligonucleótido complementario de un gen de proteína de la cápside del alfavirus y un oligonucleótido complementario de un gen de proteína estructural del alfavirus que no pertenece a la cápside. Para permitir la amplificación del sustrato de ácido nucleico y la formación de un segundo producto de reacción se proporcionan las condiciones de reacción y el tiempo adecuados. Tras completar la primera y segunda reacción, se establece la presencia o ausencia del segundo producto de reacción.

Pueden detectarse múltiples acontecimientos de recombinación proporcionando un sustrato de ácido nucleico adecuado para detectar múltiples acontecimientos de recombinación, siendo el sustrato derivado de una población de partículas de replicones del alfavirus. A continuación se hace reaccionar el sustrato de ácido nucleico con una primera mezcla de reacción que comprende un oligonucleótido complementario de un gen de proteína no estructural del alfavirus y un oligonucleótido complementario de un gen de proteína de cápside del alfavirus. Para permitir la amplificación del sustrato de ácido nucleico para formar un primer producto de reacción se proporcionan las condiciones adecuadas y durante un tiempo suficiente. A continuación, se hace reaccionar el primer producto de reacción con una segunda mezcla de reacción que comprende un oligonucleótido complementario de un gen de proteína de cápside del alfavirus y un oligonucleótido complementario de un gen de proteína estructural del alfavirus que no pertenece a la cápside. Una vez más, bajo las condiciones adecuadas y durante un tiempo suficiente para permitir la amplificación del molde de ácido nucleico para formar un segundo producto de reacción. Finalmente, se determina la presencia o ausencia del segundo producto de reacción.

Un procedimiento para detectar múltiples acontecimientos de recombinación puede comprender proporcionar un sustrato de ácido nucleico adecuado para detectar múltiples acontecimientos de recombinación. El sustrato se obtiene de una población de partículas de replicones del alfavirus y a continuación se hace reaccionar el sustrato de ácido nucleico con una primera mezcla de reacción que comprende un oligonucleótido complementario de un gen de proteína no estructural del alfavirus y un oligonucleótido complementario de un gen de proteína estructural del alfavirus que no pertenece a la cápside. Para permitir la amplificación del sustrato de ácido nucleico para formar un primer producto de reacción se proporcionan las condiciones de reacción y el tiempo adecuados. A continuación se hace reaccionar el primer producto de reacción con una segunda mezcla de reacción que comprende un oligonucleótido complementario de un gen de proteína de la cápside del alfavirus y un oligonucleótido complementario de un gen de proteína estructural del alfavirus que no pertenece a la cápside. Tras un tiempo de incubación adecuado, se determina la presencia o ausencia del segundo producto de reacción.

Al menos dos de los anteriores procedimientos para detectar múltiples acontecimientos de reacción pueden realizarse usando el mismo sustrato de ácido nucleico obtenido de una población de partículas de replicones del alfavirus.

En una forma de realización de la presente invención se cuantifica la potencia de preparación de partículas de replicones. En esta forma de realización, se proporcionan procedimientos para cuantificar o "valorar" las partículas de vectores de virus de ARN incompetentes para replicación en una muestra. Los procedimientos comprenden proporcionar una población de células empaquetadoras, poner en contacto las células empaquetadoras con la muestra bajo condiciones adecuadas y durante un tiempo suficiente para que las células se infecten con las partículas de vectores de virus incompetentes para la replicación. A continuación incubar las células empaquetadoras infectadas bajo las condiciones adecuadas y durante un tiempo suficiente para producir partículas de vectores virales y enumerar la cantidad de placas resultantes.

## Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una ilustración esquemática de una línea celular de empaquetamiento de replicones del alfavirus con una configuración de casete de expresión del gen de proteína estructural separada.

La Figura 2 es un gráfico que muestra la producción de partículas de replicones del alfavirus usando la línea celular de empaquetamiento #15-25, en una Fábrica Celular de 10 capas.

La Figura 3 es una ilustración esquemática de un sistema biorreactor CellCube™.

La Figura 4 es un gráfico que muestra la producción a escala creciente de 90 litros de partículas de replicones del alfavirus usando líneas celulares de empaquetamientos de generación temprana en un sistema CellCube™ de 100 apilamientos.

La Figura 5 es un gráfico que compara la purificación de las partículas de replicones del alfavirus usando dos procedimientos diferentes de cromatografía de intercambio iónico de una etapa.

La Figura 6 son los geles de proteínas teñidas con Coomassie que comparan la purificación de las partículas de replicones del alfavirus usando dos procedimientos diferentes de cromatografía de intercambio iónico de una etapa.

La Figura 7 es un gráfico que muestra la purificación de partículas de replicones del alfavirus usando la resina de intercambio catiónico de tipo tentacular s-Fractogel®.

La Figura 8 son los geles de proteínas teñidas con Coomassie y plata que muestran la purificación de las partículas de replicones del alfavirus usando un procedimiento cromatográfico de dos etapas.

La Figura 9 es un gráfico que muestra la inducción de células T específicas del antígeno gag de VIH usando partículas de replicones del alfavirus sometidas a precipitación por PEG o purificación cromatográfica de una etapa con Fractogel o purificación cromatográfica de dos etapas con Fractogel/S-400.

La Figura 10 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral de las partículas de replicones del alfavirus SIN que expresan IL2 en un modelo de carcinoma de colon CT26, comparado con la proteína IL-2 recombinante o partículas de replicones SIN que expresan el informador GFP.

La Figura 11 es un gráfico que muestra el uso del ensayo de ADN<sub>R</sub> (ADN ramificado) para la detección y cuantificación de ARN de replicón en una preparación de partículas de replicones del alfavirus como un medio para determinar el título.

La Figura 12 es una ilustración esquemática de un procedimiento para la detección de múltiples acontecimientos de recombinación usando amplificación de ácido nucleico para determinar la presencia o ausencia de virus competentes para la replicación contaminantes en una preparación de partículas de replicones del alfavirus.

## Definición de los términos

Los siguientes términos se usan a lo largo de toda la memoria descriptiva. A menos que se indique de otra manera, estos términos se definen como sigue:

“*Replicón del vector de ARN del alfavirus*”, “*replicón del vector de ARN*” y “*replicón*” se refieren a una molécula de ARN que es capaz de dirigir su propia amplificación o autorreplicación *in vivo*, en el interior de una célula diana. Para dirigir su propia amplificación, la molécula de ARN debe codificar la(s) polimerasa(s) necesaria(s) para catalizar la amplificación del ARN (por ejemplo, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) y contener secuencias de ARN cis necesarias para la replicación que son reconocidas y utilizadas por la(s) polimerasa(s) codificada(s). Un replicón del vector de ARN derivado de un alfavirus debe contener los siguientes elementos ordenados: secuencias virales 5' necesarias en cis para la replicación (también denominadas 5' CSE), secuencias que, cuando se expresan, codifican proteínas no estructurales del alfavirus biológicamente activas (por ejemplo, nsP1, nsP2, nsP3, nsP4), secuencias virales 3' necesarias en cis para la replicación (también denominadas 5' CSE), y una extensión de poliadenilato. El replicón del vector de ARN del alfavirus también puede contener un promotor de la “región de unión” subgenómica viral, que puede, en ciertas formas de realización, modificarse para aumentar o reducir la transcripción viral del fragmento subgenómico y la(s) secuencia(s) heteróloga(s) a expresar.

“*Partícula de Alfavirus Recombinante*”, “*partícula de replicón del alfavirus*” y “*partícula de Replicón*” se refieren a una unidad de virión que contiene un replicón del vector de ARN del alfavirus. Por lo general, la partícula de alfavirus recombinante comprende una o más proteínas estructurales del alfavirus, una envoltura lipídica y un replicón del vector de ARN. De preferencia, la partícula de alfavirus recombinante contiene una estructura de nucleocápside que está contenida dentro de bicapa lipídica derivada de la célula huésped, tal como una membrana plasmática, en la que están incluidas una o más glicoproteínas de envoltura alfaviral. La partícula puede también contener otros componentes (por ejemplo, elementos para marcación tales como biotina, otras proteínas estructurales virales, envolturas híbridas u otros ligandos de unión a receptores) que dirigen el tropismo de la partícula a partir de la que se obtuvo el alfavirus.

“*Línea celular de empaquetamiento del alfavirus*” se refiere a una célula que contiene una o más casetes de expresión de proteínas estructurales del alfavirus y que produce partículas de alfavirus recombinantes tras la introducción de un replicón del vector de ARN del alfavirus, sistema eucariota de iniciación del vector en capas, o partículas de alfavirus recombinantes. La célula original puede ser de origen mamífero o no mamífero. Dentro de las formas de realización de preferencia, la línea celular de empaquetamiento se transforma de manera estable con el (las) casete(s) de expresión de proteínas estructurales.

“*Sistema eucariota de iniciación del vector en capas*” se refiere a un conjunto que es capaz de dirigir la expresión de una secuencia o gen de interés. El sistema eucariota de iniciación del vector en capas debe contener un promotor 5' capaz de iniciar *in vivo* (es decir en el interior de una célula eucariota) la síntesis del ARN a partir de ADNc, y una secuencia de ácido nucleico del vector (por ejemplo, vector viral) capaz de dirigir su propia replicación en una célula eucariota y expresar también una secuencia heteróloga. De preferencia, la secuencia de ácido nucleico del vector es una secuencia derivada del alfavirus y está constituida por una secuencia 5' que es capaz de inicializar la transcripción de un ARN del alfavirus (denominadas también secuencias 5' virales necesarias en cis para la replicación o 5' CSE), así como también secuencias que, cuando se expresan, codifican proteínas no estructurales del alfavirus biológicamente activo (por ejemplo, nsP1 nsP2, nsP3, nsP4), y una secuencia de reconocimiento de polimerasa de ARN del alfavirus (denominadas también secuencias 3' virales necesarias en cis para la replicación o 3' CSE). Además, la secuencia del vector puede incluir un promotor de la “región de unión” subgenómica alfaviral que puede, en ciertas formas de realización, modificarse para evitar, aumentar o reducir la transcripción viral del fragmento subgenómico, así como una secuencia de poliadenilación. El sistema eucariota de iniciación del vector en capas puede también contener secuencias de reconocimiento de empalmes, una secuencia de procesamiento de la ribozima catalítica, una señal de exportación nuclear, gen heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción. En ciertas formas de realización, la síntesis *in vivo* de la secuencia de ácido nucleico del vector a partir del ADNc puede regularse por medio del uso de un promotor inducible o la expresión subgenómica puede ser inducible a través del uso de reguladores traduccionales o proteínas no estructurales modificadas.

“*Biorreactor de componente externo*” se refiere a un sistema de biorreactor modular integrado para el cultivo masivo, crecimiento y control de proceso de células unidas al sustrato. El biorreactor de componente externo debe tener un recipiente o cámara con superficie de crecimiento tratada para el cultivo tisular para la unión y propagación de las células (por ejemplo, células empaquetadoras del alfavirus). A diferencia de los biorreactores tradicionales de “tanque agitado”, que pueden tener una agitación mecánica interna (por ejemplo, impulsor) y/o sistema de burbujeo para circular los medios de cultivo y facilitar el intercambio de gases, el Biorreactor de componente externo debe tener componentes o módulos externos conectados (es decir, por medio de tuberías), para lograr funciones similares. En ciertas formas de realización, los componentes externos pueden incluir bombas, reservorios, oxigenadores, módulos de cultivo y otras partes no convencionales.

“*Resina de intercambio iónico tentacular*” se refiere a una resina, gel o matriz con grupos de carga funcionales y en la que los grupos de carga funcionales se encuentran en largas cadenas de polímeros (“tentáculos”), en lugar de estar localizadas en la superficie de la resina, gel o matriz. En ciertas formas de realización, la resina de intercambio iónico tentacular es una resina, matriz o gel catiónico que puede usarse para unir y fraccionar sustancias biológicas en base a las características de carga. Un ejemplo representativo de resina de intercambio iónico tentacular es Fractogel® EMD SO<sub>3</sub>-(M) (s-Fractogel®). En otras formas de realización, la resina de intercambio iónico tentacular es una resina, matriz o gel aniónico que puede usarse para unir y fraccionar sustancias biológicas en base a las características de carga. Un ejemplo representativo de resina de intercambio iónico tentacular es Fractogel® EMD DEAE (M).

Numerosos aspectos y ventajas de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras considerar la siguiente descripción detallada, que proporciona aclaración sobre la práctica de la invención.

### Descripción detallada de la invención

Como se indicó anteriormente, la presente invención proporciona procedimientos de cuantificación de virus y vectores derivados de virus, incluidos aquellos relacionados con alfavirus, a partir de preparaciones biológicas y químicas. Los virus y vectores cuantificados según esta invención tienen uso como vacunas y agentes terapéuticos eficaces.

#### A. Replicones de vectores y partículas de replicones de alfavirus

Los replicones y las partículas, incluidas las secuencias que codifican alfavirus adecuadas para uso en la preparación de los materiales descritos anteriormente se han descrito en detalle en otros lugar (véase, por ejemplo, Patentes de EEUU N° 5.789.245, 5.842.723, y 6.015.694; Publicaciones PCT N° WO 97/38087, WO 99/18226, WO 00/61772 y WO 00/39318), que se incorporan en este documento por referencia en su totalidad.

#### B. Secuencias heterólogas

Las partículas de replicones del alfavirus de la presente invención pueden transportar y expresar una gran diversidad de secuencias de nucleótidos, incluidas, por ejemplo, secuencias que codifican linfocinas, citocinas o quimiocinas (por ejemplo, IL-2, IL-12, GM-CSF, SLC), enzimas convertidoras de profármacos (por ejemplo, HSV-TK, VZV-TK), antígenos que estimulan una respuesta inmune (por ejemplo, antígenos de VIH; VHC, tumorales), moléculas terapéuticas tales como factores reguladores o de crecimiento (por ejemplo, VEGF, FGF, PDGF, BMP), proteínas que

ayudan o inhiben una respuesta inmune, así como ribozimas y secuencias antisentido. Las secuencias de nucleótidos anteriores incluyen aquellas a las que se hizo referencia previamente (por ejemplo, la Patente de EEUU N° 6.015.686, los documentos WO 97/38087 y WO 99/18226, WO 00/61772, y WO 00/39318), y pueden obtenerse de depósitos, fácilmente clonados a partir de ARN celular u otro ARN usando las secuencias publicadas o sintetizadas, por ejemplo, en un sintetizador de ADN Applied Biosystems Inc. (por ejemplo, sintetizador de ADN APB modelo 392 (Foster City, CA)).

#### C. Producción de partículas de replicón del alfavirus

Las partículas de replicón del alfavirus según la presente invención pueden producirse usando una diversidad de procedimientos publicados. Tales procedimientos incluyen, por ejemplo, enfoques de empaquetamiento transitorio, tal como la co-transfección de replicón transcrito *in vitro* y ARN(s) auxiliar(es) incompleto(s) (Liljestrom, Bio/Technology 9:1356-1361, 1991; Bredenbeek y col., J. Virol. 67:6439-6446, 1993; Frolov y col., J. Virol. 71:2819-2829, 1997; Pushko y col., Virology 239:389-401, 1997; Patentes de EEUU N° 5.789.245 y 5.842.723) o replicón basado en ADN de plásmido y construcciones auxiliares incompletas (Dubensky y col., J. Virol. 70:508-519, 1996), así como la introducción de replicones de alfavirus en líneas celulares de empaquetamientos estables (PCL) (Polo y col., PNAS 96: 4598-4603, 1999; Patentes de EEUU N° 5.789.245, 5.842.723, 6.015.694; Documentos WO 97/38087, WO 99/18226, WO 00/61772 y WO 00/39318).

Debe notarse que el procedimiento seleccionado para la producción de partículas de replicón debe de preferencia reducir al mínimo o eliminar la posibilidad de generar virus competente para la replicación contaminantes (RCV). Una de tales estrategias para abordar este tema de los RCV es el uso de auxiliares incompletos o PCL que contienen casetes de expresión de proteínas estructurales “separados” (véase Patente de EEUU N° 5.789.245). En este contexto, los genes de proteínas estructurales del alfavirus se separan dentro de construcciones de expresión separadas (por ejemplo, cápside separada de glicoproteínas) tal que sean necesarios múltiples acontecimientos de recombinación para regenerar un complemento completo de proteínas estructurales, que es extremadamente improbable.

En formas de realización de preferencia, se utilizan líneas celulares empaquetadoras de alfavirus estables para la producción de partículas del replicón (Figura 1). La PCL puede transfectarse con ARN del replicón transcrito *in vitro*, puede transfectarse con el replicón basado en ADN de plásmido (por ejemplo, vector ELVIS), o puede infectarse con una población de siembra de partículas del replicón, y a continuación incubarse bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para producir partículas de replicón empaquetadas de título elevado en el sobrenadante del cultivo. En formas de realización particularmente de preferencia, se utilizan PCL en un procedimiento de dos etapas, en el que como una primera etapa, se produce una población de siembra de partículas del replicón transfectando la PCL con un replicón basado en ADN de plásmido. A continuación se produce una población mucho mayor de partículas de replicón en la segunda etapa, al infectar un cultivo fresco de la PCL con la población de siembra. Esta infección puede llevarse a cabo usando diversas multiplicidades de infección (MOI), incluidas una MOI = 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 3, 5 ó 10). De preferencia la infección se realiza a una MOI baja (por ejemplo, menor que 1). Las partículas de replicón en títulos  $> 10^8$  unidades infecciosas (UI)/ml pueden recogerse durante el tiempo de la PCL infectada con la población de siembra. Además, las partículas de replicón pueden posteriormente pasarse en cultivos aún mayores de PCL vírgenes mediante por medio de repetida infección de multiplicidad baja, dando como resultado preparaciones de escala comercial con el mismo título elevado. En gran medida, usando PCL de la configuración estructural genética “separada”, estas poblaciones de partículas de replicones están libres de RCV contaminantes detectables.

Como se describió anteriormente, la producción a gran escala de partículas de replicones de alfavirus puede llevarse a cabo usando un biorreactor. De preferencia, el biorreactor es un Biorreactor de Componente Externo, que es un sistema de biorreactor modular integrado para cultivo masivo, crecimiento y control de proceso de células unidas al sustrato. La unión y propagación de las células (por ejemplo, células empaquetadoras del alfavirus) tiene lugar en un recipiente o cámara con superficies tratadas con cultivo tisular, y las células están con medios frescos para aumentar la productividad celular. Los controles y ajustes se realizan para parámetros tales como gases, temperatura, pH, glucosa, etc., y el vector bruto se recoge usando una bomba de perfusión. Típicamente, los componentes individuales de un Biorreactor Externo separan los módulos externos que están conectados (es decir, por medio de tuberías). Los componentes externos pueden ser bombar, reservorios, oxigenadores, módulos de cultivo y otras partes no convencionales. Un ejemplo representativo de un Biorreactor de Componente Externo es el sistema CellCube™ (Corning, Inc.).

Además de usar el Biorreactor de Componente Externo descrito en este documento, puede también usarse un Biorreactor de Tanque Agitado más convencional, en ciertos casos, para la producción de partículas de replicón del alfavirus. En un Biorreactor de Tanque Agitado, las células empaquetadoras del alfavirus pueden no estar unidas a ninguna matriz (es decir, flotando en suspensión) o pueden estar unidas a una matriz (por ejemplo, polidiscos, micro o macro vehículos, perlas). Como alternativa, puede usarse un Sistema de Cultivo de Fibra Hueca.

#### D. Purificación usando resinas de intercambio iónico

Tras la recogida, pueden aclararse los sobrenadantes brutos de cultivos que contienen las partículas de replicón del alfavirus pasando a través de un filtro (por ejemplo, de tamaño de poro 0,2  $\mu\text{M}$ , 0,45  $\mu\text{M}$ , 0,65  $\mu\text{M}$ , 0,8  $\mu\text{M}$ ). Opcionalmente, los sobrenadantes brutos pueden someterse a centrifugación a velocidad lenta previo a la filtración para eliminar desechos celulares grandes. Puede añadirse una endonucleasa (por ejemplo, Benzonase, Sigma #E8263) a la preparación de partículas de replicón del alfavirus antes o después de una etapa de purificación cromatográfica

para digerir el ácido nucleico exógeno. Además, la preparación puede concentrarse previo a la purificación usando uno de los tantos procedimientos ampliamente conocidos (por ejemplo, filtración de flujo tangencial).

Las partículas de replicón del alfavirus brutas o aclaradas pueden concentrarse y purificarse por medio de técnicas cromatográficas (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía por afinidad). Dos o más de tales procedimientos de purificación pueden llevarse a cabo de manera secuencial. Al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico puede realizarse y utilizar una resina de intercambio iónico tentacular. Brevemente, pueden cargarse los filtrados aclarados de partículas de replicón del alfavirus en una columna que contenga una matriz o resina de intercambio iónico cargada (por ejemplo, intercambio aniónico o catiónico). La matriz o resina puede estar constituida por una diversidad de sustancias, incluidas pero no limitadas a agarosa reticulada, poliestireno reticulado, estireno reticulado, resina hidrófila de poliéter, resina acrílica y resina basada en metacrilato. El componente intercambiador de iones puede comprender, pero no está limitado a, un intercambiador catiónico seleccionado de la lista constituida por intercambiador catiónico de sulfopropilo, un intercambiador catiónico de carboximetilo, un intercambiador de ácido sulfónico, un intercambiador catiónico de sulfonato de metilo y un intercambiador de  $\text{SO}_3^-$ . El componente intercambiador iónico puede comprender pero no está limitado a, un intercambiador aniónico seleccionado de la lista constituida por DEAE, TMAE y DMAE. De mayor preferencia, la cromatografía de intercambio iónico se lleva a cabo usando un intercambiador catiónico tentacular, en el que la resina de intercambio iónico es una resina basada en metacrilato con un intercambiador catiónico de  $\text{SO}_3^-$  (por ejemplo, Fractogel<sup>®</sup> EDM  $\text{SO}_3^-$ ).

Las partículas de replicón pueden estar unidas a la resina de intercambio iónico tras uno o más lavados con tampón que contenga una sal (por ejemplo, NaCl 250 mM o menos). A continuación las partículas de replicón pueden eluirse de la columna en forma purificada usando un tampón con concentración salina aumentada. Las concentraciones salinas pueden ser de al menos 300 mM, 350 mM, 400 mM, 450 mM ó 500 mM. La elución puede controlarse de preferencia por medio de un espectrofotómetro a 280 nm, pero también por medio de un ensayo de valoración del replicón, un ensayo de transferencia de expresión (TOE) o análisis de proteínas en gel con posterior tinción con Coomassie o transferencia Western.

El tampón de elución de concentración salina más alta puede intercambiarse posteriormente por un tampón más deseable, por ejemplo, por medio de dilución en la disolución acuosa adecuada o haciendo pasar el eluato que contiene las partículas por una columna de exclusión molecular. Además, el uso de una columna de exclusión por tamaño molecular puede también proporcionar, en ciertos casos, más purificación. Por ejemplo, pueden usarse cromatografía en Sephacryl S-500 o S-400 (Pharmacia) tanto como un intercambiador de tampón como para purificar más las fracciones que contienen las partículas de replicón eluidas de una columna de intercambio iónico. Usando esta resina particular, las partículas de replicón generalmente se eluyen en el último volumen de vaciado y muestran mejora en el nivel de pureza ya que algunos de los contaminantes son más pequeños en peso molecular y quedan retenidos más tiempo en la columna. Sin embargo, también pueden usarse resinas alternativas de diferentes composiciones así como de exclusión por tamaño que puedan dar resultados similares o mejores. En estas estrategias, podrían incorporarse resinas de tamaño mayor tales como Sephacryl S-1000 que permitirían a las partículas de replicón entrar en la matriz y por consiguiente permanecer retenidas durante más tiempo, permitiendo el fraccionamiento.

#### E. Procedimientos para determinar el título de las partículas de replicón

En el campo de los vectores virales están muy aceptados dos procedimientos de valoración de partículas de replicón del alfavirus. El primer procedimiento de valoración es un simple ensayo de transferencia de expresión, en el que se infecta un cultivo de células vírgenes con diversas diluciones (por ejemplo, diluciones en serie) de la preparación desconocida de partículas de replicón y se cuantifican las células individuales que expresan el gen codificado de interés para obtener el título original. La identificación de las células que expresan el gen codificado de interés puede realizarse según la proteína específica expresada (por ejemplo, fluorescencia para un informador GFP, tinción química para  $\beta$ -gal, inmunocitoquímica para proteínas con anticuerpo disponible). Como alternativa, puede usarse una línea celular informadora del alfavirus (por ejemplo, Olivo y col., *Virology* 198:381-384, 1984) en combinación con partículas de replicón que expresan un gen informador, que sirve como una curva patrón de título conocido. Los valores de los desconocidos, obtenidos tras la infección de la línea celular informadora con diversas diluciones, puede extrapolarse para calcular el título.

La presente invención describe otros procedimientos de cuantificación de partículas de replicón en una preparación, y estos procedimientos no están limitados en base a la preparación, tales como de un gen de interés a otro. El primer procedimiento está basado en la detección del ácido nucleico y amplificación del producto de ácido nucleico o señal específicos para el ensayo. Tales procedimientos pueden incluir, por ejemplo, ensayos de PCR, TMA y  $\text{ADN}_R$  (ADN ramificado). Estos ensayos basados en ácidos nucleicos proporcionan niveles de detección extremadamente sensibles. Más específicamente, en el caso de un ensayo basado en  $\text{ADN}_R$ , se diseñó una sonda de ADN de hebra única que es específica y única para una región de ARN del replicón y genómico del alfavirus. Esta sonda está unida a la placa de ARNR. Las células diana que se han infectado con diluciones en serie de preparaciones de partículas de replicón se lisan y se transfieren directamente a la placa de ADN. Tras la incubación durante la noche, el ARN genómico del alfavirus hibrida con la sonda de ARN de hebra única homóloga. A continuación se lava la placa para aclarar el material no específico y posteriormente se incuba con una serie de amplificadores de hibridación. La señal generada se basa en la luminiscencia y puede analizarse en un espectrofotómetro. Usando preparaciones de partículas



de replicón informadoras de título conocido puede generarse una curva patrón, por ejemplo, con un vector que codifica  $\beta$ -galactosidasa o proteína fluorescente verde. El título de la muestra desconocida se determina por extrapolación.

5 El segundo procedimiento de cuantificación es por complementación del vector de replicón para permitir la detección por ensayo en placas en células cultivadas. Los vectores virales de incompletos para la replicación, tales como los replicones del alfavirus, que tienen delección de uno o más genes que codifican proteínas estructurales necesarias para el empaquetamiento son considerados, “vectores suicidas” y no pueden propagarse de célula a célula. Como tal, los procedimientos de cuantificación de ensayo en placa tradicionales son imposibles. La presente invención proporciona un procedimiento para llevar a cabo el ensayo en placa usando células empaquetadoras que expresan las proteínas  
10 estructurales necesarias requeridas para la producción de partículas de progenie. Las células empaquetadoras usadas para tal ensayo pueden contener una o más casetes de expresión de proteínas estructurales. En el caso de partículas de replicón del alfavirus, las células empaquetadoras se infectan con diluciones en serie de preparaciones de partículas de replicón, se superponen y se enumeran las placas.

15

#### F. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender partículas de replicón del alfavirus purificadas en combinación con un vehículo, diluyente o recipiente farmacéuticamente aceptable. Según se usa en este documento, purificada  
20 significará una preparación de partículas de replicón del alfavirus libre de proteínas que no pertenecen al alfavirus detectables. La detección de proteínas que no pertenecen al alfavirus se determina por electroforesis en gel usando un tamaño de muestra de entre aproximadamente  $10^8$  y  $10^9$  partículas de replicón. Los procedimientos de electroforesis en gel incluyen, pero no se limitan a, electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), electroforesis de disco y SDS-PAGE, seguidas por tinción convencional con Coomassie. Más específicamente, “purifica” significará preparaciones  
25 de partículas de alfavirus sometidas a procedimientos de purificación por cromatografía de múltiples etapas como se dispuso en este documento. Para formar una suspensión acuosa puede añadirse una cantidad suficiente de tampón de formulación a las partículas de replicón purificadas. El tampón de formulación puede comprender un sacárido y un componente tamponador en agua, y puede también contener uno o más aminoácidos o un aditivo estructural de alto peso molecular. El tampón de formulación se añade en cantidad suficiente para alcanzar una concentración final  
30 deseada de los constituyentes y para reducir al mínimo la dilución de las partículas del replicón. A continuación, la suspensión acuosa puede almacenarse, de preferencia a  $-70^\circ\text{C}$ , o puede secarse inmediatamente.

La suspensión acuosa puede secarse por liofilización o evaporación a temperatura ambiente. Brevemente, la liofilización incluye las etapas de enfriar la suspensión acuosa por debajo de la temperatura de transición del gas o por  
35 debajo de la temperatura del punto eutéctico de la suspensión acuosa, y eliminar agua de la suspensión fría por sublimación para formar una partícula de replicón liofilizada. Las alícuotas de los virus recombinantes formulados pueden colocarse en una Cámara Refrigeradora de Edwards (unidad RC3S de 3 estantes) unidas a un secador por congelación (Supermodulo 12K). Para liofilizar las partículas de replicón formuladas se usa un procedimiento de liofilización de múltiples etapas como describieron Phillips y col. (Cryobiology 18:414, 1981), de preferencia desde una temperatura  
40 de  $-40^\circ\text{C}$  hasta  $-45^\circ\text{C}$ . Las composiciones resultantes contienen menos del 10% de agua por peso de las partículas de replicón liofilizadas. Una vez liofilizadas, las partículas de replicón son estables y pueden almacenarse a  $-20^\circ\text{C}$  hasta  $25^\circ\text{C}$ , como se discute con más detalle a continuación. En el procedimiento de evaporación, se elimina el agua de la suspensión acuosa a temperatura ambiente por evaporación. El agua puede eliminarse por medio de un procedimiento de secado por atomización, en el que la suspensión acuosa se administra en un flujo de gas precalentado, que da como  
45 resultado usualmente la rápida evaporación del agua de las gotas de la suspensión. Una vez deshidratado, el virus recombinante es estable y puede almacenarse a  $-20^\circ\text{C}$  hasta  $25^\circ\text{C}$ .

Las soluciones acuosas usadas para la formulación comprenden de preferencia un sacárido, un componente tamponador y agua. La solución puede también incluir uno o más aminoácidos y un aditivo estructural de alto peso molecular.  
50 Esta combinación de componentes actúa para conservar la actividad de las partículas de replicón tras el congelamiento y también tras la liofilización o el secado por medio de evaporación. Aunque un sacárido de preferencia es la lactosa, pueden usarse otros sacáridos, tales como sacarosa, manitol, glucosa, trehalosa, inositol, frutosa, maltosa o galactosa. Una concentración particularmente de preferencia de lactosa es al 3%-4% en peso.

55 El aditivo estructural de alto peso molecular ayuda a evitar la agregación de las partículas durante el congelamiento y proporciona soporte estructural en el estado liofilizado o seco. Dentro del contexto de la presente invención, se considera que los aditivos estructurales son de “alto peso molecular” si tienen un PM mayor de 5000. Un aditivo estructural de alto peso molecular de preferencia es la albúmina sérica humana. Sin embargo, pueden también usarse otras sustancias, tales como hidroxietil celulosa, hidroximetil celulosa, dextrano, celulosa, gelatina o povidona. Una  
60 concentración particularmente de preferencia de albúmina sérica humana es al 0,1% en peso.

El componente tamponador actúa para tamponar la disolución al mantener un pH relativamente constante. Pueden usarse una diversidad de tampones, dependiendo del intervalo de pH deseado, de preferencia entre 7,0 y 7,8. Los tampones adecuados incluyen tampón de fosfato y tampón de citrato. Además, resulta de preferencia que la disolución  
65 acuosa contenga una sal neutra que se usa para ajustar las partículas de replicón formuladas finales hasta una concentración salina isoosmótica adecuada. Las sales neutras adecuadas incluyen cloruro de sodio, cloruro de potasio o cloruro de magnesio. Una sal de preferencia es el cloruro de sodio. Las partículas de replicón liofilizadas o deshidratadas de la presente invención pueden reconstituirse usando una diversidad de sustancias, pero de preferencia

se reconstituyen usando agua. En ciertos casos, pueden también usarse disoluciones de sales diluidas que llevan a la formulación final a la isotonicidad.

#### G. Procedimientos para administrar las partículas de replicón

Los procedimientos para administrar una secuencia heteróloga seleccionada a un mamífero de sangre caliente (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano u otro animal de sangre caliente tal como un caballo, vaca, cerdo, oveja, perro, gato, rata o ratón) para uso como una vacuna o agente terapéutico, comprenden la etapa de administrar al mamífero partículas de replicón purificadas y/o caracterizadas según se describió en este documento. La administración puede ser por medio de una diversidad de rutas (por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, oral, intraocular, intranasal, rectal, intratumoral). Además, las partículas de replicón pueden administrarse directamente (es decir, *in vivo*), o a células que se han retirado (*ex vivo*) y posteriormente se devuelven al mamífero de sangre caliente.

Los siguientes se incluyen para ilustrar más completamente el campo de la invención. Estos ejemplos no intentan limitar el alcance de la misma.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1

##### *Producción de partículas de replicón del alfavirus usando una línea celular de empaquetamiento*

Para demostrar la escalabilidad de la producción de partículas de replicón en cultivos adherentes de una celular de empaquetamiento del alfavirus, se realizaron experimentos en una Nunc Cell Factory de 10 bandejas o en un Corning Cell Cube. Por ejemplo, se suspendieron  $2,5 \times 10^8$  células de una línea celular empaquetadora de alfavirus, PCL #15,25, que expresa proteínas estructurales de Sindbis con tropismo para células dendríticas humanas (Gardner y col., J. Virol., 74:11849-11857, 2000) en 100 ml de Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con penicilina, estreptomycin, L-glutamina y suero de ternera fetal al 1% (FCS). A esta suspensión, se le añadieron  $1,26 \times 10^8$  partículas de replicón SIN que codifican un informador GFP (Gardner y col., 2000, *ibid*) a una multiplicidad de infección (MOI) de aproximadamente 0,57 partículas por célula. La suspensión se incubó a 37°C y se mezcló suavemente cada 15 minutos durante aproximadamente 1,5 horas. Posteriormente se añadió la suspensión a 1 litro de DMEM con FCS al 5% precalentado (37°C), se transfirió a una Nunc Cell Factory de 10 bandejas y se colocó en un equipo de incubación a 34°C, CO<sub>2</sub> al 5%. Los intercambios completos de medio se realizaron a las 22 horas, 30 horas, 44 horas, 52 horas, 70 horas, 78 horas y 90 horas posteriores a la infección y se determinaron los títulos de las partículas de replicón para cada recogida (Figura 2). Se combinaron los líquidos del cultivo recogidos para las recogidas de título más elevado (recogidas 1-5), se transfirieron a botellas de centrifuga y se sedimentaron los desechos celulares por centrifugación a 2.500 RPM en un centrífuga Sorvall RT6000 a 4°C durante 15 minutos. A continuación se pasó el sobrenadante a través de una unidad de filtración de acetato de celulosa de 0,2 µm y se usó para purificación cromatográfica como se describe en el Ejemplo 2 a continuación. Se realizaron producciones similares usando más de una Cell Factory, para aumentar la recogida total de partículas de replicón del alfavirus proporcionalmente:

La producción a gran escala de partículas de replicón del alfavirus puede también realizarse, usando el sistema de biorreactor CellCube™ (Figura 3). El sistema Cell-Cube™ es un biorreactor modular integrado con cámaras de crecimiento de capas múltiples (100 apilamientos) de 85.000 cm<sup>2</sup> de área de superficie. El control de las mezclas de oxígeno, CO<sub>2</sub> y aire permite controlar con precisión los parámetros de pH y DO<sub>2</sub>. Junto con el control y ajuste de la glucosa este nivel del control del cultivo proporciona una capacidad aumentada para la producción de partículas de replicón.

Los procedimientos de producción de partículas de replicón del alfavirus basados en PCL usando el sistema CellCube™ requieren el ingreso de una población de siembra inicial de partículas de replicón a amplificar. Para demostrar la viabilidad de este enfoque, la producción con CellCube™ se realizó expandiendo la PCL sucesivamente en matraces T de cultivo celular de 225 cm<sup>2</sup>, y aumentando hasta un área de superficie de hasta cuatro Cell Factory de 10 capas previo a la infección en suspensión con la población de siembra de partículas. Las PCL se sometieron a tratamiento con tripsina usando una mínima cantidad de tripsina, se diluyeron con medio de cultivo y a continuación se centrifugó brevemente. Las células resuspendidas se contaron, se separaron en mitades iguales y se infectaron con la población de siembra de partículas de replicón a una infección de baja MOI. Se dejó que la infección se produjera en suspensión con agitación suave durante 30 minutos. Tras 30 minutos, se colocó un recipiente sobre hielo y el otro se transfirió al recipiente de inoculación que contiene 7 l de medio de inoculación DMEM FBS al 5%. Los 7 l de suspensión celular infectada se transfirieron al Cell-Cube y se hizo rotar el módulo de cultivo 90° para permitir la unión de las células. Tras 60 minutos, se drenó la suspensión nuevamente del recipiente de inoculación y se añadió el segundo vial de PCL infectada (del hielo). Esta suspensión, como la primera, se transfirió al módulo de cultivo, que se hizo rotar 180° para permitir que estas células se adhieran al lado opuesto de las placas de soporte de cultivo. Tras 3 horas, se hizo rotar el sistema nuevamente hasta la posición horizontal y se volvió a llenar con DMEM al 5%, HEPES 20 mM, tras lo que se inició la circulación y se ajustaron los gases para mantener los niveles de pH y DO<sub>2</sub>. Las muestras diarias permitieron realizar pruebas y obtener un perfil de los indicadores metabólicos incluidos los niveles de glucosa. El sistema de perfusión se ajustó en base al consumo de glucosa y a los datos previos para asegurar el máximo rendimiento del vector. Se usó la recogida automatizada y continua en recipientes a 4°C para reducir al

## ES 2 312 447 T3

mínimo la degradación inducida por la temperatura de las partículas de replicón y permitir el máximo rendimiento y la proporción más elevada de partículas de replicón viables.

5 Las producciones iniciales del CellCube™ ilustradas para este ejemplo se realizaron usando replicón de generación temprana y líneas celulares de empaquetamiento (previo a la obtención de PCL #15-25 anterior). Se sabe que estas versiones anteriores de reactivos rinden partículas de replicón del alfavirus en títulos más bajos (Polo y col. 1999, PNAS 96:4598-4603) que los reactivos ahora disponibles, sin embargo tales técnicas son idénticas a las que se usarían para cualquier replicón del vector y línea celular de empaquetamiento derivados posteriormente. Los datos obtenidos usando estos reactivos indican que pueden generarse lotes de producción a gran escala (90-100 litros) en un módulo  
10 CellCube™ de 100 apilamientos, con la misma eficacia de título que los experimentos de empaquetamiento a pequeña escala de investigación (Figura 4). Los sistemas ampliados CellCube™ que usan cuatro módulos de 100 apilamientos, por consiguiente, tienen el potencial para producir fácilmente más de 400 litros de material de producción de partículas de replicón por vez.

15 Para generar poblaciones de siembra de partículas de replicón del alfavirus sin una etapa previa de transcripción *in vitro*, las líneas celulares de empaquetamiento deben transfectarse con un replicón basado en ADN de plásmido (Sistema Eucariota de Iniciación del Vector en Capas) que codifique el gen heterólogo de interés. Las transfecciones a gran escala se realizan en Cell Factory de 10 capas de Nunc, usando el procedimiento del fosfato de calcio según los siguientes parámetros. Se plaquean las células empaquetadoras en el Cell Factory un día antes de la transfección a una densidad de  $8 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Se prepara la mezcla de ADN:fosfato de calcio en un volumen de 200 ml, se diluye con  
20 1 litro de medio y se añade a la línea celular de empaquetamiento en el Cell Factory. El medio se intercambia tras 6-8 horas y el material de la población de siembra de partículas de replicón se recoge en múltiples lotes, durante un período de 2-3 días. Se combinan los materiales recogidos, se purifican y se generan alcuotas para almacenamiento durante largo plazo a -80°C. A continuación, el material de población de siembra de partículas de replicón del alfavirus puede  
25 usarse para amplificaciones posteriores a gran escala en PCL vírgenes (por ejemplo, en un biorreactor CellCube). Un experto en la técnica puede sustituir fácilmente por procedimientos alternativos de transfección del replicón basado en ADN de plásmidos, incluidos pero no limitado a la transfección mediada por lípidos y la electroporación.

### Ejemplo 2

30 *Purificación de partículas de replicón usando resina de intercambio catiónico s-Fractogel®*

Para comparar la eficacia de la purificación de partículas de replicón usando una resina de intercambio catiónico tentacular, Fractogel® EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (M) (s-Fractogel®, EM Industries), con la resina de intercambio iónico Matrix®  
35 Sulfato de Cellufine™ (Amicon), se equilibraron columnas del mismo tamaño con fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 125 mM, pH 7,0. Se hicieron pasar los sobrenadantes aclarados de los cultivos (aproximadamente 260 ml) que contenían partículas de replicón SIN-GFP generadas según se describió (Polo y col., PNAS 96:4598-4603, 1999) a través de las columnas de s-Fractogel® y Sulfato de Cellufine™ a un caudal de 115 y 75 cm/hora, respectivamente. Se lavaron las columnas con aproximadamente 20-40 volúmenes de la columna de tampón que contenía fosfato de  
40 sodio 10 mM, cloruro de sodio 250 mM, pH 7,0, y se eluyeron las partículas de replicón SIN-GFP unidas en 20 ml de un gradiente lineal de NaCl 0,5 M-2,0 M y se recogieron en fracciones de 1 ml. Para eliminar cualquier partícula de replicón restante se usó a continuación NaCl hasta 3 M final.

Para el análisis, se combinaron las fracciones consecutivas en pares comenzando con las fracciones 2 y 3, siguiendo  
45 con 4 y 5, etc. Se determinaron los títulos de las partículas de replicón (UI total) para las fracciones recuperadas, así como del material de partida, la carga y el lavado (Figura 5). En base a los resultados del ensayo de valoración, los 260 ml de material de partida de sobrenadante aclarado contenían aproximadamente  $2,4 \times 10^{10}$  UI total. La recuperación en los picos principales de elución de la columna de s-Fractogel® fue de  $1,3 \times 10^{10}$  UI total, o aproximadamente el 55% de la carga, con prácticamente todo (99%) concentrado en las fracciones 2 y 3 combinadas. Las siguientes purificaciones usando s-Fractogel indicaron una recuperación promedio del 80-90%. En contraste, la recuperación total de la columna de Sulfato de Cellufine™ fue coherentemente inferior, y para este experimento fue de aproximadamente  $3,0 \times 10^8$  UI  
50 total (o < 2%) en las dos fracciones principales, dando como resultado de esta manera un producto considerablemente más diluido.

También se analizó las purezas de las muestras sometiendo las fracciones recogidas a electroforesis en gel de  
55 poliacrilamida (tinción de Coomassie, Figura 6) y transferencia Western (no mostrada). Los resultados de los geles SDS PAGE al 10-20% teñidos con Coomassie indicaron una mejora en la pureza del pico de s-Fractogel® comparado con el pico de Sulfato de Cellufine™ (véase bandas de cápside de partícula SIN y glicoproteínas en la muestra 2). De modo interesante, el pico máximo de partículas recuperadas, hallado en las fracciones 2 y 3 combinadas de cada columna, eluyó justo antes de un pico considerable de contaminantes en la fracción 4 y 5 combinadas de cada columna. De excluir el material de las fracciones 4/5 de los productos combinados de la columna de Sulfato de Cellufine™ por la cantidad aumentada de impurezas, se reducirá aún más la recuperación eficaz.

Además de la mayor eficacia de purificación, el coste para la columna de s-Fractogel® es considerablemente  
65 inferior que para el Sulfato de Cellufine™. El análisis de coste para el componente de la resina sólo indica una disminución de coste de aproximadamente 3 veces con s-Fractogel®, asumiendo que pueden usarse iguales cantidades de resina. Sin embargo, los datos sugieren que puede haber una sobrecarga en la columna de Sulfato de Cellufine™ y que puede ser necesaria más resina para lograr una capacidad de unión equivalente. Finalmente, el caudal reducido

para la columna de Sulfato de Cellufine™ se traduciría en un aumento del 50% en el tiempo de procesamiento de la columna y por consiguiente, otro aumento de coste por operación. Tomados juntos, el procedimiento de purificación de s-Fractogel® de la presente invención proporciona utilidad general superior para la fabricación comercial a gran escala de partículas de replicón del alfavirus.

En otros experimentos, se purificaron también volúmenes mayores de partículas de replicón del alfavirus (por ejemplo, los generados usando al menos una Cell Factory) usando el procedimiento de s-Fractogel®. Por ejemplo, se empaquetó un total de 25 ml de s-Fractogel® en una columna Pharmacia AK-26 y se equilibró con 20 volúmenes de la columna de tampón (fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0 y NaCl 125 mM) a un caudal lineal de 115 cm/hora. Tras llegar al equilibrio, se hicieron pasar por la columna aproximadamente 5,5 litros de sobrenadante del cultivo que contenía el replicón del alfavirus (véase Ejemplo 1). Se lavó la columna con aproximadamente 30 ml de tampón de lavado (fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, NaCl 250 mM), y se eluyeron las partículas en fracciones de 12 ml por medio de tampón que contenía fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, NaCl 400 mM.

La determinación de la recuperación e identificación de las fracciones pico que contenían partículas del replicón del alfavirus se realizó por ensayo de valoración en el que se diluyeron en serie alícuotas del material de partida, el flujo, el lavado y las fracciones eluidas y se usaron para infectar células BHK-21. Los resultados de este procedimiento de purificación (Figura 7) indican que los 5,5 litros de sobrenadante recogido contenían partículas de replicón con un título de aproximadamente  $1,2 \times 10^8$  UI/ml y que sólo se encontraron cantidades insignificantes de partículas en el flujo o en el lavado. La concentración más elevadas de partículas purificadas eluidas se encontró en las fracciones 2a y 3a eluidas de la columna a una concentración de  $1,3 \times 10^{11}$  y  $1,4 \times 10^{10}$  UI/ml.

### Ejemplo 3

#### *Estimulación de la respuesta inmune usando partículas de replicón del alfavirus*

Para demostrar la potente estimulación de respuestas inmunes específicas de antígeno usando partículas de replicón del alfavirus purificadas, se insertó la secuencia que codifica p55gag de VIH-1 en replicones basados en SIN. La secuencia codificadora de gag de VIH se seleccionó de la cepa SF2 de VIH-1 (Sánchez-Pescador, R, y col., Science 227(4686): 484-492, 1985; Luciw, P.A., y col., Patente de EEUU N° 5.156.949, incorporada en este documento por referencia; Luciw, P.A., y col., Patente de EEUU N° 5.688.688). Estas secuencias se usaron directamente o se manipularon previamente para maximizar la expresión de sus productos genéticos. Para maximizar la expresión, se modificó el patrón de uso de codones de VIH-1 de manera que la secuencia codificadora del ácido nucleico resultante fue comparable con el uso de codones que se encuentra en genes humanos ampliamente expresados. El uso de codones de VIH refleja un alto contenido de los nucleótidos A o T como tercera base del triplete de codones. El efecto del uso de codones de VIH-1 es un alto contenido de AT en la secuencia de ADN que podría dar como resultado una disminuida capacidad de traducción e inestabilidad de ARNm. En comparación, los codones humanos altamente expresados prefieren los nucleótidos G o C como la tercera base. Por consiguiente, se modificó la secuencia codificadora de gag para que resulte comparable con el uso de codones que se encuentra en los genes humanos altamente expresados.

En primer lugar se clonó el fragmento de ADN para gag en el vector de expresión eucariota pCMVKm2, derivado de pCMV6a (Chapman y col., Nuc. Acids Res. 19:3979-3986, 1991), para generar la construcción pCMVKm2.Gag Mod.SF2. Este plásmido se depositó el 18 de enero de 1999 con la Chiron Corporation Master Culture Collection, Emeryville, CA, 94662-8097, y con la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. A continuación se subclonó el gen de gag de VIH en un vector de replicón SIN (SINCR, Gardner y col., *ibid*) para generar las partículas de replicón del alfavirus por digestión con EcoRI, con extremos romos Klenow y dNTPs, purificación con GeneCleanII, y digestión con Sa/I. El fragmento codificador de gag de VIH se unió a continuación en el vector SINCR que se había digerido con NotI, se habían generado extremos romos y se había digerido con XhoI. El vector resultante se denominó SINCR-gag.

Para comparar la purificación eficaz así como para demostrar el mantenimiento de la inmunogenicidad de las partículas de replicón purificadas en columna, se llevó a cabo un proceso de producción de Nunc Cell Factories de 4 x 10 bandejas. Se suspendieron aproximadamente  $2 \times 10^9$  de la línea celular de empaquetamiento del alfavirus, PCL#15.25 en 400 ml de Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con penicilina, estreptomycin, L-glutamina y suero de ternera fetal al 1% (FCS). A esta suspensión, se le añadieron  $1 \times 10^{10}$  partículas de replicón SIN que codifican p55 Gag de VIH a una multiplicidad de infección (MOI) de aproximadamente 5. La suspensión se incubó a 37°C y se mezcló suavemente cada 15 minutos durante aproximadamente 1 hora. Posteriormente se dividió la suspensión en 4 alícuotas de 100 ml y se añadió cada alícuota de 100 ml a 1 litro de DMEM con FCS al 5% precalentado (37°C), se transfirió a una Nunc Cell Factory de 10 bandejas y se colocó en un equipo de incubación a 34°C, CO<sub>2</sub> al 5%. Los intercambios completos de medio se realizaron a las 20 horas, 28 horas y 40 horas posteriores a la infección. Los líquidos del cultivo recogidos de cada recogidas se transfirieron a botellas de centrifuga, y se sedimentaron los desechos celulares por centrifugación a 2.500 RPM en un centrífuga Sorvall RT6000 a 4°C durante 15 minutos y se hizo pasar el sobrenadante resultante a través de una unidad de filtración de acetato de celulosa de 0,2 µm. Se cargaron aproximadamente 8 l de sobrenadante en una columna de 2,6 cm de diámetro que contenía 30 ml de resina s-Fractogel equilibrada con fosfato de sodio 10 mM, NaCl 125 mM, pH 7,0. Para los primeros 5 litros se usó un caudal de 58 cm/hora y para los últimos 3 l un caudal de 115 cm/hora. Se aclaró la columna con fosfato de sodio 10 mM, NaCl 125 mM, pH 7,0 seguido por dos etapas de lavado que contenían fosfato de sodio 10 mM, NaCl 250 mM, pH 7,0 y a continuación fosfato de sodio 10 mM, NaCl 300 mM. Las partículas se eluyeron con fosfato de sodio 10 mM, NaCl 400

## ES 2 312 447 T3

mM, pH 7,0. Se combinaron las dos fracciones pico de s-Fractogel (N° 2 y N° 3) y se cargaron 10 ml de la combinación en una columna de Sephacryl S-400 HR (Pharmacia) (diámetro = 2,6 cm, volumen de columna = 490 ml) equilibrada con tampón que contenía lactosa 40 mg/ml en PBS. El caudal fue de 3,3 ml/minuto y cada fracción contenía 12 ml. Se analizó el título de recuperación en muestras del s-Fractogel y del S-400 así como también la pureza determinada por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción de Coomassie y plata. En base al ensayo de valoración, el ciclo del 4-Cell Factory generó aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  UI de partículas totales. Se cargaron aproximadamente  $8 \times 10^{11}$  UI en la columna de s-Fractogel y se eluyeron aproximadamente  $6 \times 10^{11}$  UI en el pico principal dando una recuperación del 75%. Del pico del s-Fractogel, se cargaron  $3 \times 10^{11}$  UI en la columna S-400, con una elución de aproximadamente  $1,5 \times 10^{11}$  UI en el pico principal dando como resultado una recuperación del 50%. En la Figura 8 se muestran la pureza relativa de las muestras del s-Fractogel y del S-400.

Para determinar si las partículas de replicón SIN purificadas que codifican VIH- p55 mantenían la inmunogenicidad, se diseñó un estudio para comparar las partículas purificadas con una preparación de partículas esencialmente purificadas, pero concentradas (precipitación con polietilenglicol) usando un ELISPOT de IFN- $\gamma$  específico de Gag. En el estudio, se inmunizaron ratones (5 ratones por grupo) con preparaciones de partículas de replicón SIN-gag ( $10^6$  UI/animal) que se habían precipitado con PEG, purificado con una única etapa de cromatografía de intercambio catiónico, o un procedimiento de dos etapas de cromatografía de intercambio catiónico seguido por cromatografía de exclusión por tamaño. Los animales recibieron inmunizaciones en los días 0 y 21 con recogidas de muestras en los días 29 y 30.

Para medir el número de células secretoras de IFN- $\gamma$  específico de Gag, se realizó un ensayo ELISPOT. Se añadieron suspensiones de células únicas de nódulos linfáticos cervicales y bazo combinados de los ratones en cada grupo a placas de nitrocelulosa o pvdf (Millipore) previamente recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-INF- $\gamma$  anti-ratón de rata (Pharmingen) y bloqueadas con medio RPMI completo a pH 7,2, que contenía suero de ternera fetal al 10%, Hepes 5 mM y antibióticos. Tras la incubación de las células durante la noche en presencia de péptido p7g derivado de gag, o anti-CD3 (Pharmingen) y anti-CD28 (Pharmingen) como control positivo para activación policlonal de células T, o medio sólo como control negativo, se lavaron las placas y se añadió anti-IFN- $\gamma$  biotinilado (Pharmingen) en PBS/BSA al 0,1%/Tween al 0,02% y se incubó a TA durante 2 horas. Se lavaron las placas con P/T y se incubaron durante 1 hora a 37°C con avidina-peroxidasa (Pharmingen) a una dilución de 1:1000. Se lavaron las placas con PIT y se visualizaron las manchas añadiendo DAB en tampón Tris-HCl (pH 7,5) durante 30 minutos. Se lavaron las placas con H<sub>2</sub>O desionizada y se secaron al aire. Se restaron las manchas de fondo de los pocillos de los controles negativos (sólo la media) de los pocillos activados con el péptido gag-p7g. El número de manchas en los pocillos de control positivo (activados de manera policlonal con anti-CD3 y anti-CD28) fue 5-10 veces más elevado que el número de manchas en los pocillos activados con el péptido gag-p7g. Las manchas se contaron con un lector de ELISPOT automatizado de desarrollo propio usando un programa de Alpha Innotech Corporation (San Leandro, CA).

Los resultados que se muestran en la Figura 9 son representativos de dos experimentos independientes de dos combinaciones de cada grupo expresados como el número de células que secretan IFN- $\gamma$  específico del péptido gag-p7g por  $10^7$  células mononucleares. Los resultados indican que no hay pérdida de inmunogenicidad en ninguno de los procedimientos de purificación.

De manera similar, la estimulación de una respuesta antitumoral se demostró en un sistema de carcinoma de colon CT26 ampliamente aceptado administrando partículas de replicón del alfavirus derivadas de SIN que expresan la citocina IL-2. Se insertó el gen de IL-2 en el vector del replicón SIN tras la amplificación por PCR y se produjeron las partículas de replicón usando los procedimientos descritos anteriormente. En los cuatro días sucesivos tras la inoculación del tumor, se inyectaron  $10^8$  partículas de replicón SIN-IL2 por vía intratumoral a los ratones. Otros animales recibieron el diluyente solo como control, proteína IL2 recombinante que tiene una eficacia clínicamente establecida en seres humanos o partículas de SIN-GFP. Se controló el aumento del volumen tumoral en los animales y se compararon las medias de grupo para cada brazo de grupos de tratamiento. Cuando la media de grupo para un brazo dado (por ejemplo, control de diluyente) alcanzó los 2.000 mm<sup>3</sup>, se sacrificaron los animales comparados. Como se observa en la Figura 10, los animales tratados con SIN-IL2 mostraron una respuesta antitumoral significativa que fue al menos comparable con la de la proteína IL2 recombinante.

### 55 Ejemplo 4

#### *Caracterización de las partículas de replicón del alfavirus*

Para cuantificar el número de partículas de replicón en una preparación, se describen en este documento dos nuevos procedimientos. En el primer caso, se proporcionan líneas celulares de empaquetamiento del alfavirus estables (véase por ejemplo, los documentos US 5789245, US 5843723 y WO 99/18226). Las líneas celulares de empaquetamiento expresan cada una de las proteínas estructurales del alfavirus (por ejemplo, cápside, glicoproteínas) necesarias para la producción de las partículas del alfavirus, que no están codificadas por el mismo vector de replicón del alfavirus. Se plaquearon células de la línea celular de empaquetamiento #15-25 (véase anteriormente) en placas de 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente 80-90% en el momento de la infección. A continuación se diluyeron en serie diluciones en serie de una preparación de partículas de replicón de SIN que expresan un gen informador y se usaron para infectar las células por duplicado, a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, se eliminó el inóculo, se cubrieron las placas con agarosa y se incubaron las células infectadas a 37°C. Las placas se visualizaron 48-72 horas

más tarde, momento en el que podían cuantificarse directamente o tras teñirlas con un colorante tal como rojo neutro o violeta cristal.

5 En el segundo caso, se realizó la detección de partículas de replicón del alfavirus basada en ácido nucleico como un medio para cuantificar, usando la técnica de amplificación de ADN<sub>R</sub> (Wilber, Immunol Invest 1997, 26:9-13) como una forma de realización. La Figura 11 muestra los datos representativos de un experimento en el que se determinó el título de partículas de replicón de SIN que expresan el antígeno VIH-gag. Se desarrolló una curva patrón inicialmente usando diluciones en serie de las partículas de replicón de SIN que expresan el informador GFP, ya que la cuantificación previa de este material podía realizarse por ensayo de transferencia de expresión directa (TOE) y contando las células verdes en un microscopio de fluorescencia. Como la estructura central del replicón del vector era idéntica entre SIN-GFP y SIN-gag, la detección de ácidos nucleicos podía realizarse usando una sonda específica del gen no estructural idéntica, ya que ambas preparaciones de partículas diferían solamente en el gen heterólogo expresado.

15 Además de cuantificar el número de partículas de replicón en una preparación, resulta también ventajoso (o necesario) determinar la presencia o ausencia de virus competentes para la replicación (RCV) contaminantes en la preparación. Tales RCV, si están presentes, serían el resultado de la recombinación de ARN durante el proceso de empaquetamiento del replicón. Los expertos en la técnica reconocen desde hace tiempo que la prueba de RCV debe realizarse usando ensayos convencionales en placa, con o sin pasaje en serie previo en células cultivadas vírgenes. Para aumentar el nivel de sensibilidad de detección de RCV y para detectar los múltiples acontecimientos de recombinación necesarios para generar los RCV en un sistema de empaquetamiento de alfavirus "auxiliar separado", se desarrolló un ensayo basado en ácido nucleico según se describe en este documento (Figura 12). En este ensayo, primero se extrae una preparación que contiene partículas de replicón para aislar el sustrato de ácido nucleico (por ejemplo, ARN) presente. El sustrato de ácido nucleico se incluye a continuación en una primera mezcla de reacción de PCR que comprende un primer oligonucleótido complementario con una secuencia del alfavirus no presente en la(s) secuencia(s) auxiliar(es) (por ejemplo, Rep-Directa, específica del gen de proteína no estructural en la Figura 12), y un segundo oligonucleótido complementario con un gen de proteína estructural del alfavirus (por ejemplo, DH1 Inversa o DH2 Inversa, en la Fig. 12), en el que la proteína estructural es una proteína de cápside o una proteína estructural que no pertenece a la cápside (por ejemplo, glicoproteína). Un producto de reacción de esta reacción identificará específicamente un acontecimiento de recombinación entre el vector del replicón y cualquier gen de proteína estructural que contenga el auxiliar diseñado para ser complementario con el segundo oligonucleótido. Por consiguiente, por ejemplo, si el segundo oligonucleótido era el oligonucleótido específico para el gen de cápside DH2 Inv, un acontecimiento de recombinación entre el replicón y el auxiliar que contiene el gen de cápside (por ejemplo, DH2) podría ser detectado por el producto de reacción. Además, en base a la longitud del producto de reacción, pueden también detectarse múltiples acontecimientos de recombinación en esta etapa, pero uno puede no necesariamente establecer si tales acontecimientos de recombinación incluyeron todos los elementos del gen estructural necesarios para la generación del RCV o simplemente la recombinación con múltiples copias del mismo auxiliar del gen de proteína estructural (por ejemplo, dos copias de la cápside de DH2).

40 Por consiguiente, tras la amplificación, el(los) producto(s) de reacción de la primera mezcla de reacción se incluye(n) en una segunda mezcla de reacción de PCR que comprende un oligonucleótido complementario con un gen de proteína de cápside del alfavirus (por ejemplo, DH2 Inv) y un oligonucleótido complementario a un gen de proteína estructural del alfavirus (por ejemplo, DH1 Dir) que no pertenece a la cápside (por ejemplo, glicoproteína). Por ejemplo, si la primera reacción dio como resultado un producto que fue amplificado usando oligonucleótidos específicos de cápside y replicón (por ejemplo, Rep-Dir y DH2 Inv), que indican recombinación entre ARN del replicón y ARN auxiliar que contiene cápside, entonces la capacidad para sintetizar un segundo producto de reacción en una segunda reacción que contiene el primer producto de reacción como molde y oligonucleótidos complementario con un gen de cápside del alfavirus por ejemplo, DH2 Inv) y un gen de proteína estructural que no pertenece a la cápside (por ejemplo, DH1 Dir), sería indicativo de acontecimientos de recombinación múltiples.

50 De preferencias, se realizan dos primeras reacciones separadas para identificar un gen recombinante de cápside (por ejemplo, usando Rep-Dir e DH2 Inv) o un gen recombinante de proteína estructural que no pertenece a la cápside (por ejemplo, usando Rep-Dir e DH1 Inv). Cada una de estas reacciones se someterán posteriormente a una segunda reacción como se describió anteriormente, que permite la identificación de todos los acontecimientos de recombinación múltiples que podrían dar como resultado los RCV.

55 De manera similar, tal enfoque puede usarse para identificar el empaquetamiento de un ARN auxiliar incompleto en partículas dentro de una preparación, así como el co-empaquetamiento de replicón y ARN auxiliar incompleto dentro de las partículas. Por ejemplo, la capacidad para amplificar la secuencia del gen de cápside (por ejemplo, DH2 Dir más DH2 Inv) o del gen de proteína estructural que no pertenece a la cápside (por ejemplo, DH1 Dir más DH1 Inv), sin la capacidad para amplificar un producto resultante de la recombinación (por ejemplo, Rep-Dir más DH1 Inv o DH2 Inv) sería indicativo de ARN auxiliar presente en partículas empaquetadas.

65 Todas las referencias incluidas publicaciones, solicitudes de patentes y patentes citadas en este documento se incorporan al mismo por referencia con el mismo alcance que tendrían si cada referencia se incorporara individualmente y específicamente por referencia y se presentasen en su totalidad en este documento.

Los términos "un" y "una" y "el" y "la" y términos similares usados en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben interpretarse como ambos, el singular y el

plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. La enumeración de intervalos de valores en este documento tiene la intención de servir simplemente como procedimiento abreviado para referirse individualmente a cada valor dentro del intervalo por separado, a menos que se indique de otra manera en este documento, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se enumerase individualmente en este documento. Todos los procedimientos descritos en este documento pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otra manera o que el contexto indique claramente lo contrario. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o del lenguaje ejemplar (por ejemplo “tal como”) proporcionados en este documento tiene la intención de simplemente aclarar mejor la invención y no representa una limitación en el alcance de la invención de otra manera reivindicada. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como indicando algún elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

La agrupación de elementos alternativos o formas de realización de la invención descritos en este documento no deben interpretarse como limitaciones. Puede referirse y puede reivindicarse a cada miembro del grupo individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo y otros elementos hallados en este documento. Se prevé que uno o más miembros de un grupo pueden estar incluidos en, o eliminados de, un grupo por razones de conveniencia y/o patentabilidad. Cuando se presenta cualquiera de tales inclusiones o eliminaciones, en este documento se considera que la memoria descriptiva contiene el grupo según la modificación y por consiguiente cumple con la descripción escrita de todos los grupos de Markush usados en las reivindicaciones.

En este documento se describen formas de realización de preferencia de esta invención, incluido el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Por supuesto, las variaciones en las formas de realización de preferencia resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras leer la anterior descripción. Los inventores esperan que los expertos usen tales variaciones según sea adecuado, y los inventores tienen la intención de que la invención se lleve a la práctica de manera diferente a la descrita específicamente en este documento. Por consiguiente, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes del contenido presentado en este documento en las reivindicaciones según lo permita la ley vigente. Además, la invención abarca toda combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles a menos que se indique de otra manera en este documento o esté contraindicado claramente por el contexto.

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para cuantificar partículas de vectores de replicón del alfavirus que comprende:

- 5
- a) proporcionar una población de células empaquetadoras;
  - b) poner en contacto dichas células empaquetadoras con dichas partículas de vectores de replicón del alfavirus bajo condiciones adecuadas y durante un tiempo suficiente para que dichas células se infecten con dichas partículas de vectores de replicón del alfavirus;
  - c) incubar dichas células empaquetadoras infectadas bajo condiciones adecuadas y durante un tiempo suficiente para producir dichas partículas de vectores de replicón del alfavirus;
  - d) enumerar la cantidad de placas resultantes.
- 10
- 15

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células empaquetadoras expresan todas las proteínas estructurales necesarias para empaquetar dichas partículas de vectores de replicón del alfavirus.

3. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células empaquetadoras comprenden al menos un casete de expresión que expresa una proteína de cápside del alfavirus y al menos una glicoproteína del alfavirus.

4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas células empaquetadoras expresan una proteína de cápside del alfavirus y al menos una glicoproteína del alfavirus a partir de casetes de expresión diferentes.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



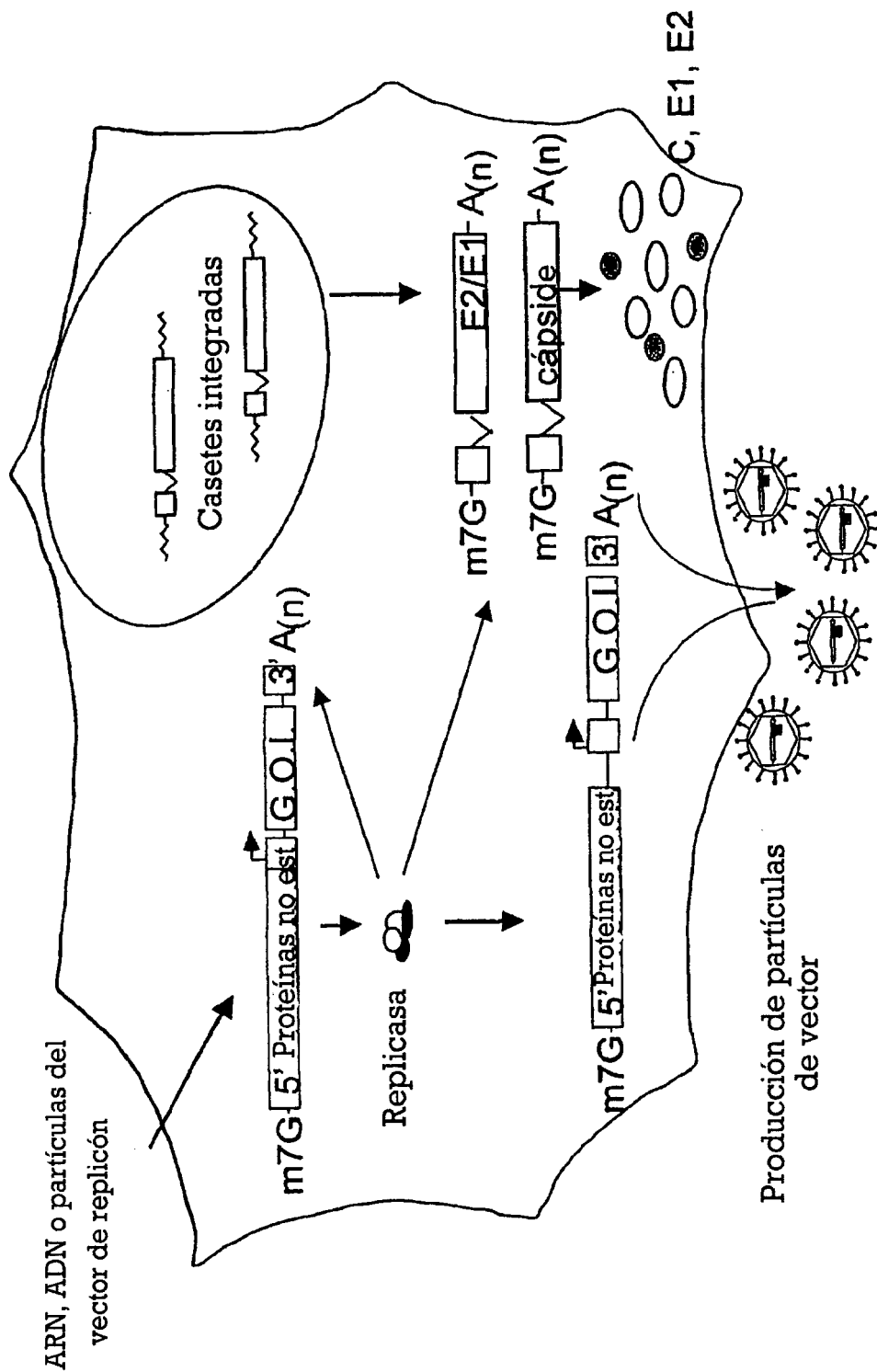


Figura 1

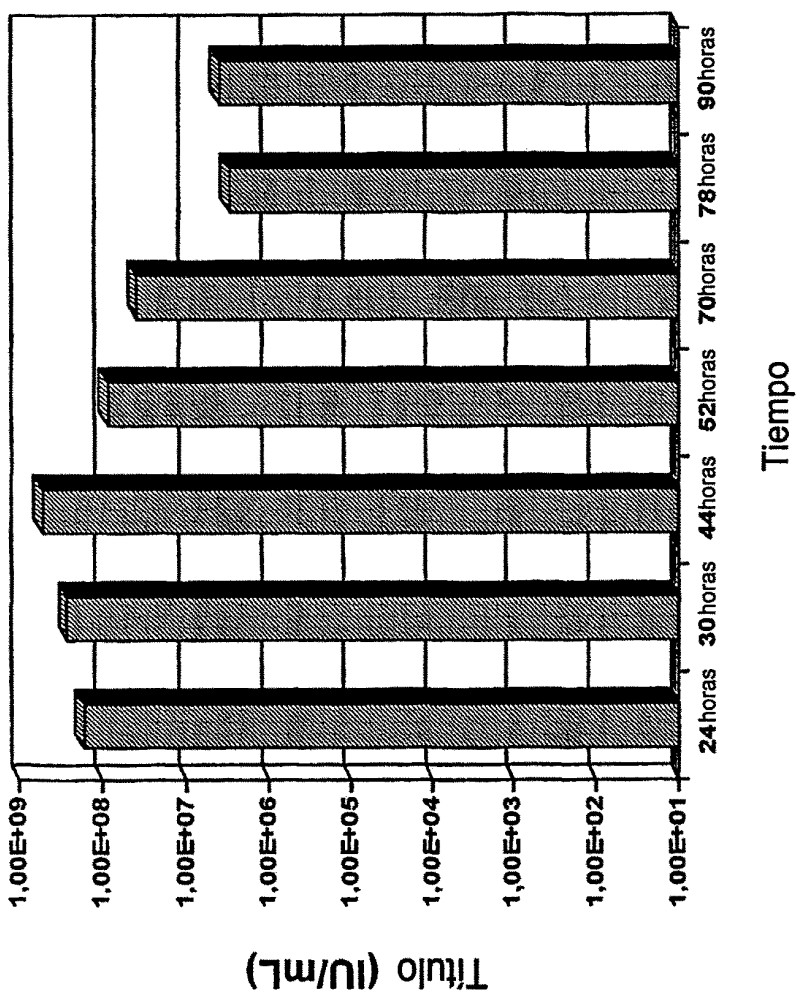
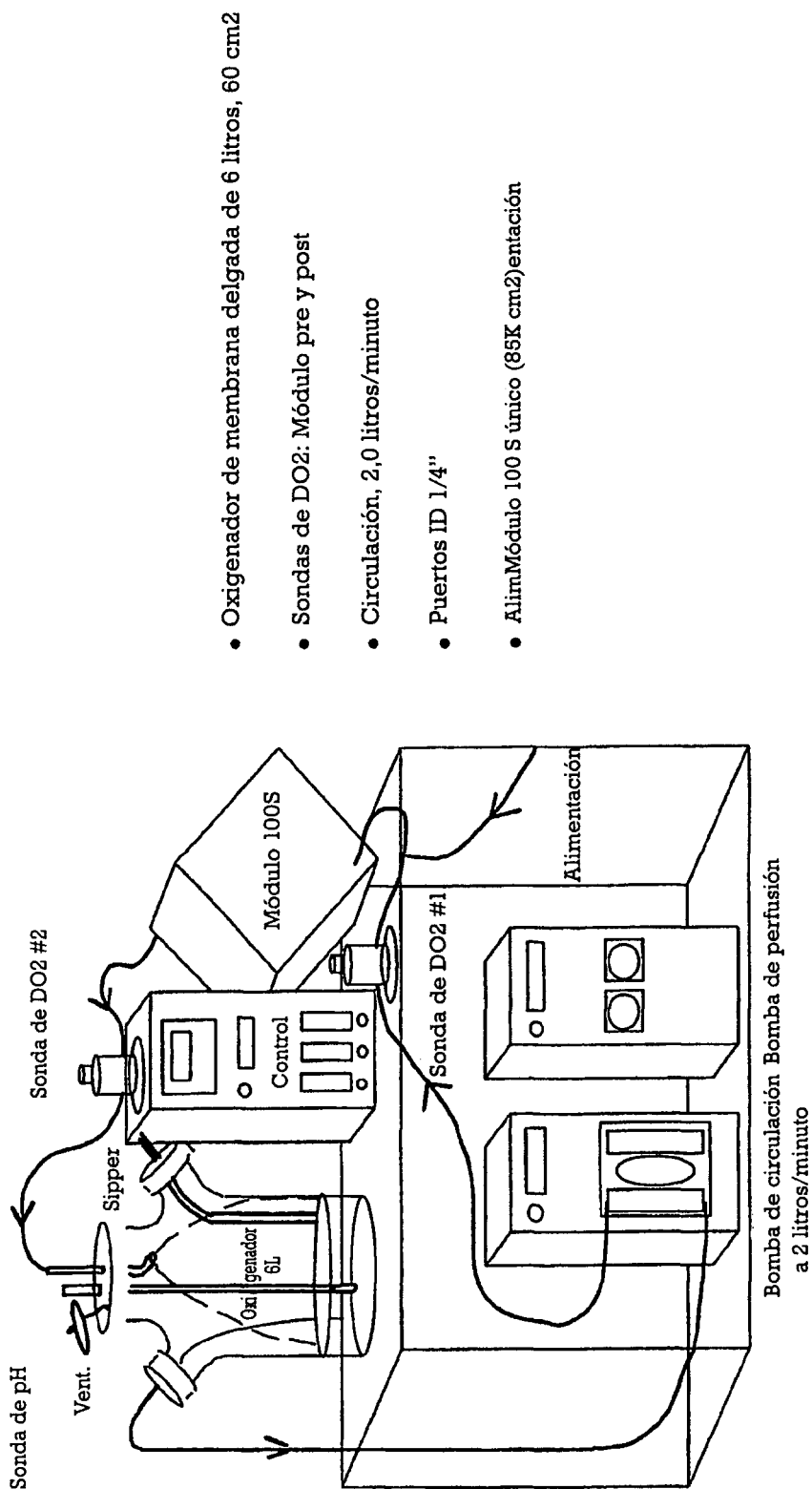


Figura 2



- Oxigenador de membrana delgada de 6 litros, 60 cm<sup>2</sup>
- Sondas de DO<sub>2</sub>: Módulo pre y post
- Circulación, 2,0 litros/minuto
- Puertos ID 1/4"
- AlimMódulo 100 S único (85K cm<sup>2</sup>)entación

Figura 3

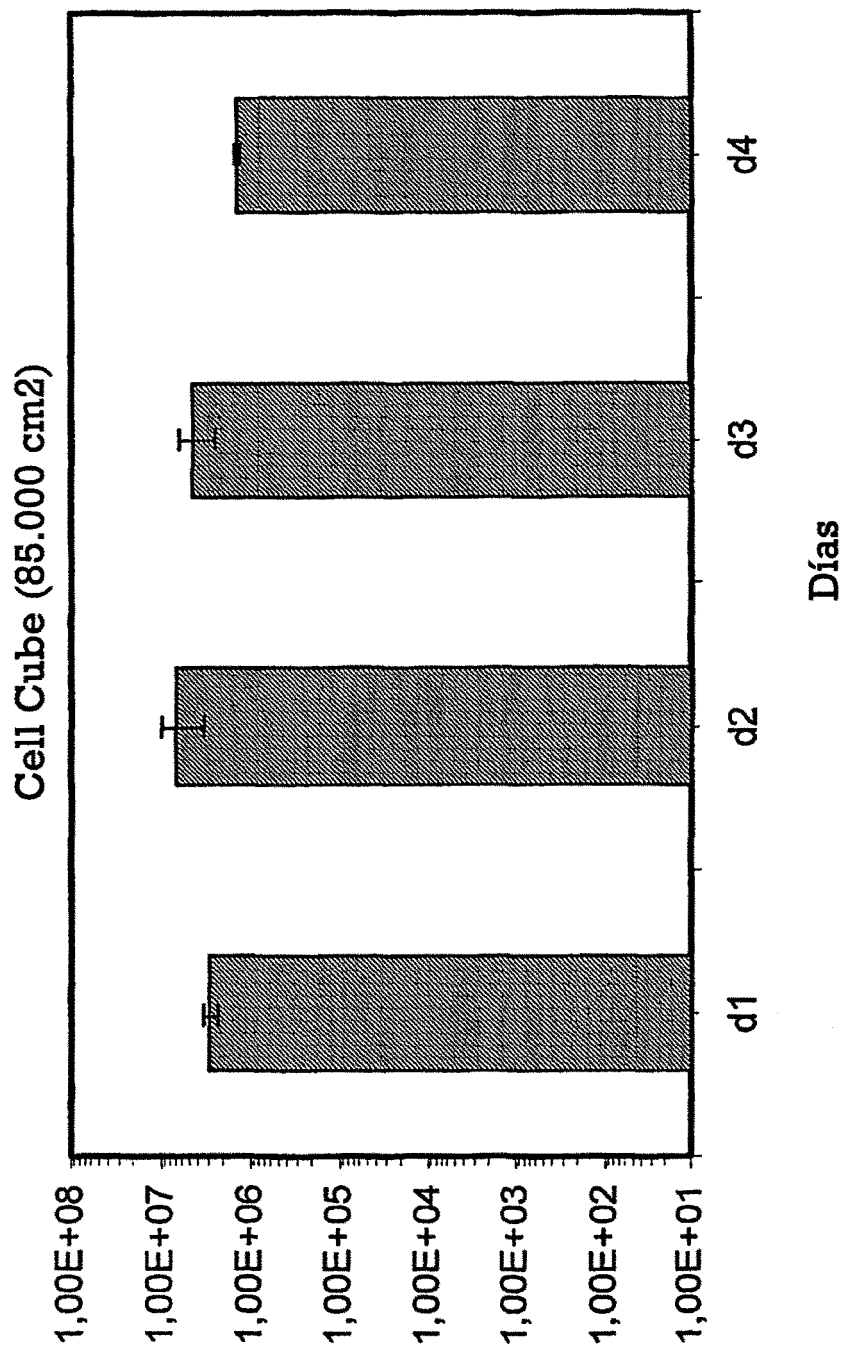
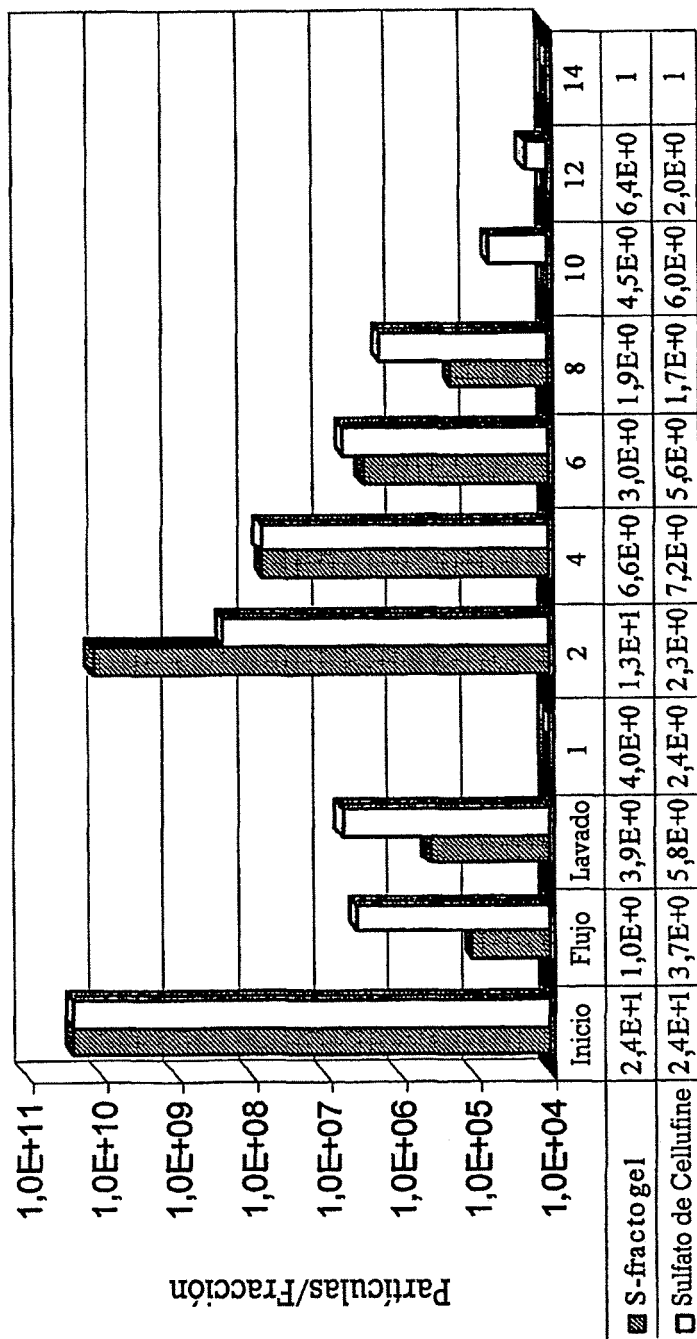


Figura 4



Fracciones

Figura 5

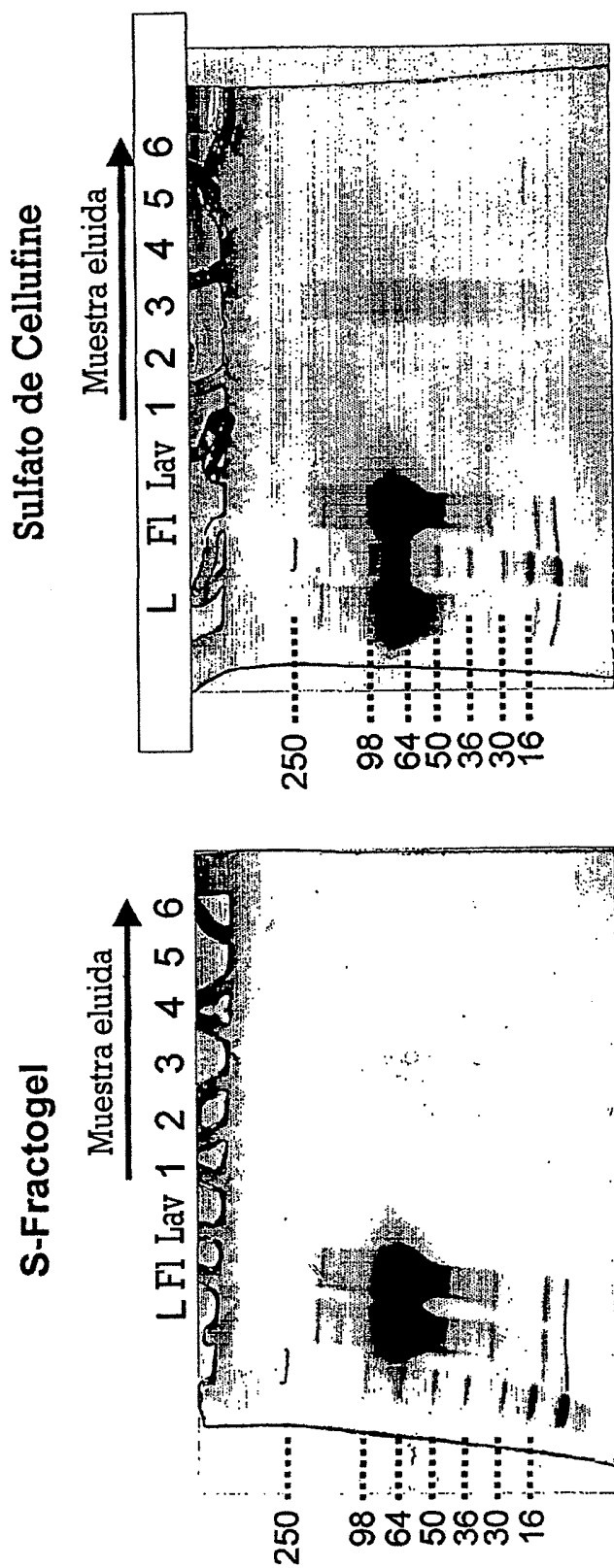


Figura 6

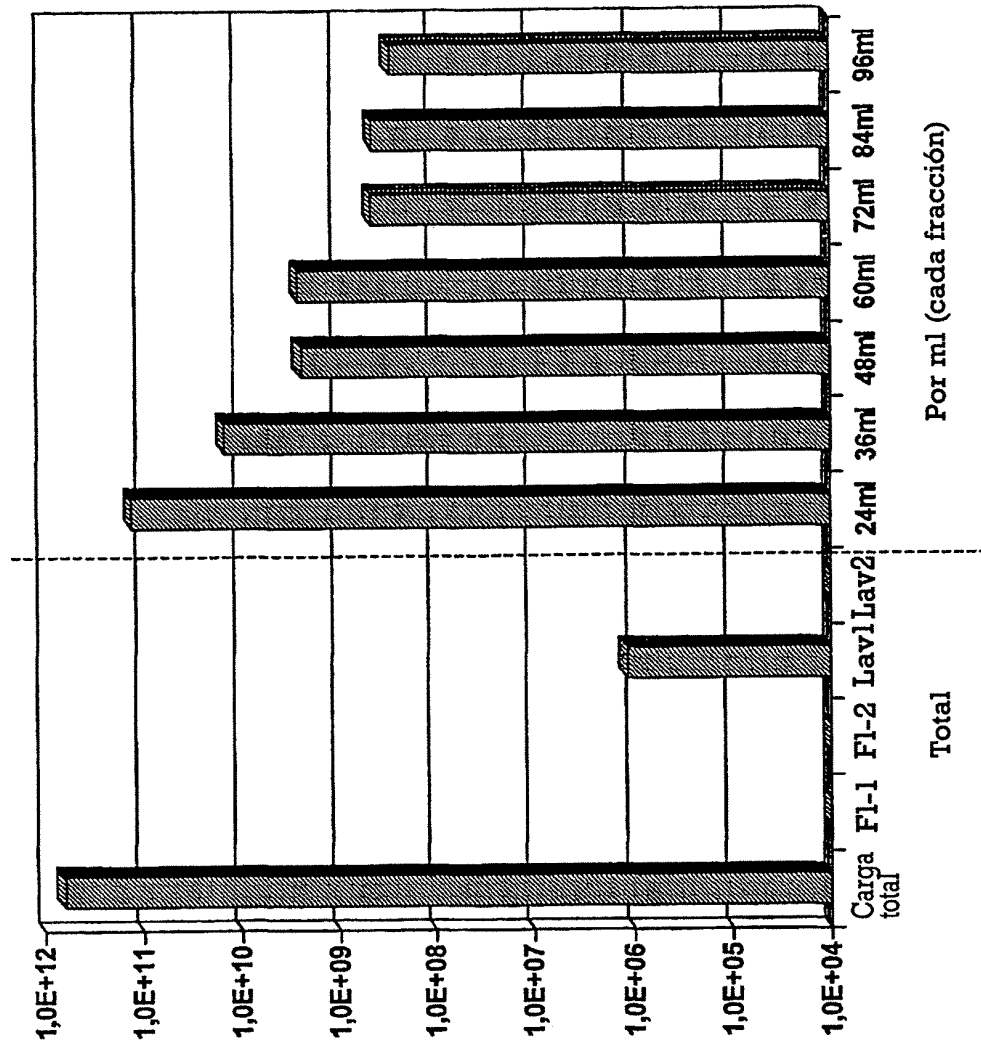


Figura 7

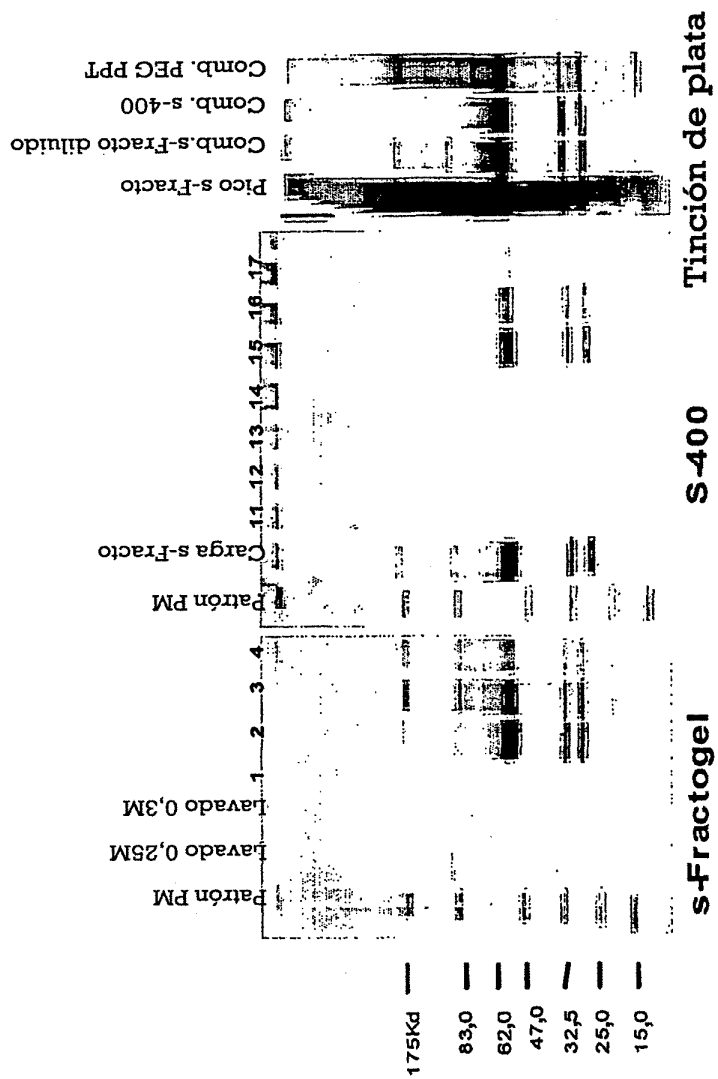


Figura 8



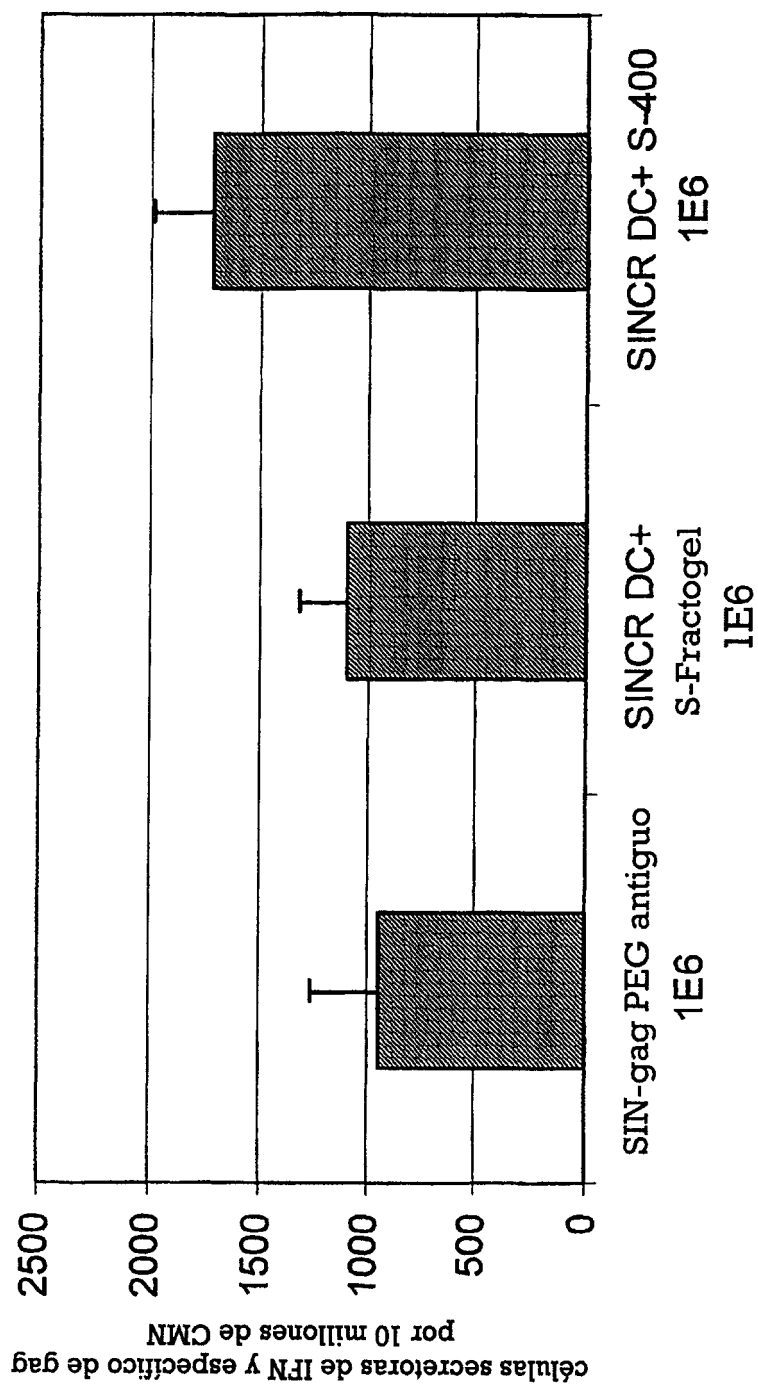
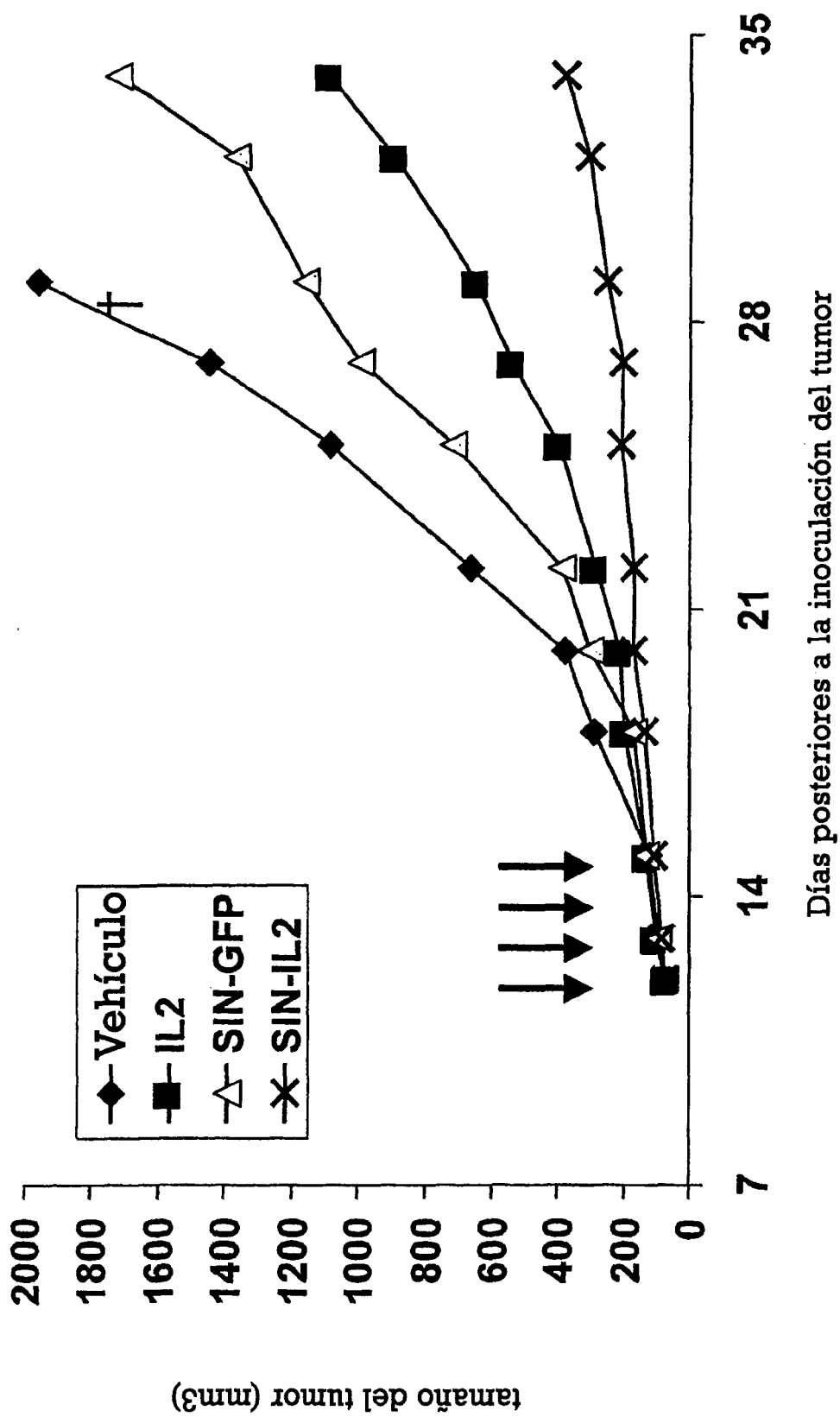


Figura 9



Días posteriores a la inoculación del tumor

Figura 10

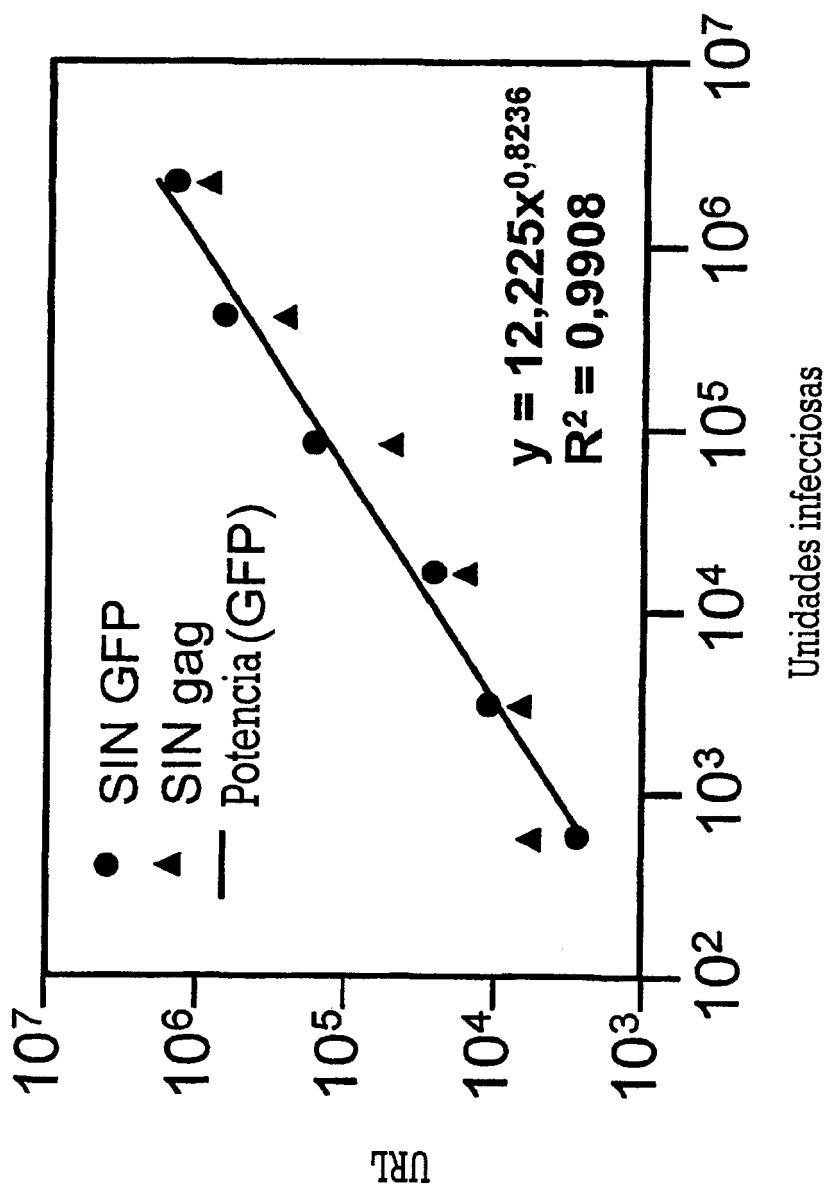


Figura 11

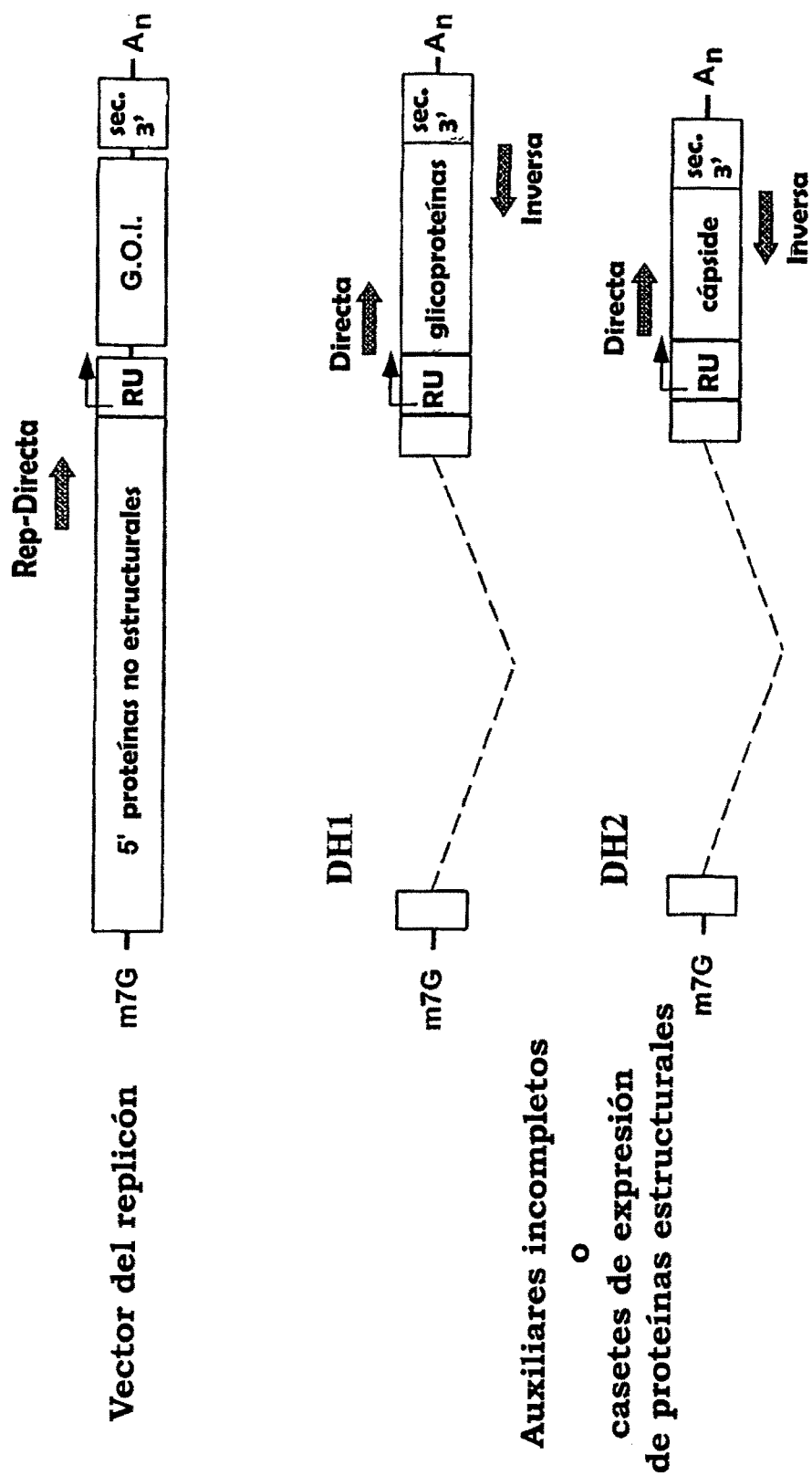


Figura 12