

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 773**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/86** (2006.01)

**C12N 7/04** (2006.01)

**A61K 39/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2008** **E 08868316 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013** **EP 2238255**

54 Título: **Vectores arenavíricos defectuosos en la replicación**

30 Prioridad:

**27.12.2007 EP 07025099**

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

**20.01.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT ZÜRICH (100.0%)  
PROREKTORAT MNW RÄMISTRASSE 71  
8006 ZÜRICH, CH**

72 Inventor/es:

**PINSCHER, DANIEL D.;  
FLATZ, LUKAS;  
BERGTHALER, ANDREAS y  
ZINKERNAGEL, ROLF**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 438 773 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

Vectores arenavíricos defectuosos en la replicación

**Campo de la invención**

La invención se refiere a arenavirus modificados genéticamente que son adecuados como vacunas o vectores para  
5 terapia génica, y a procedimientos para utilizarlos en la vacunación y en el tratamiento de enfermedades.

**Antecedentes de la invención**

Las vacunas preventivas representan uno de los capítulos más exitosos de la medicina moderna, que han conducido a la erradicación mundial de la viruela y al control de la polio, el sarampión y muchas otras enfermedades infecciosas devastadoras. Más recientemente empiezan a estar disponibles vacunas para prevenir el cáncer y se  
10 está poniendo mucho empeño en conseguir explotar «vacunas» de una forma terapéutica, lo que alimenta las esperanzas de cara a infecciones y neoplasias malignas. Históricamente, las estrategias de vacunación han comprendido metodologías muy diferentes: tras comenzar con el uso de agentes infecciosos de tipo silvestre y la auto(rre)inoculación de las células tumorales, y luego seguir con agentes vivos atenuados y tejidos tumorales muertos, la medicina clínica se ha acercado con el tiempo cada vez más hacia el uso de proteínas (inertes) y/o otros  
15 extractos (que se suelen denominar «antígeno») procedentes de agentes infecciosos o tumores, respectivamente. Este proceso gradual representa la búsqueda de una formulación de vacuna más segura, a menudo acompañada, sin embargo, por una relativa pérdida de la eficacia. En los últimos años, el avance de la ingeniería biológica ha hecho posible otra estrategia más que los investigadores colocan en la actualidad entre las más prometedoras: los agentes infecciosos que sirven de «transbordador» (llamado «vector») están equipados con un antígeno del  
20 microorganismo patógeno o del tumor de elección. Por lo tanto, la respuesta inmunitaria del destinatario de la vacuna reconoce el antígeno de interés en un contexto que potencia enormemente la inmunidad («inmunógeno») que confiere el vector.

El «estrategia mediante vector» también ha permitido dirigir la introducción de genes foráneos en las células vivas a nivel de cultivo de tejidos, pero también en los organismos pluricelulares, entre ellos el hombre, y por lo tanto, los  
25 vectores se pueden explotar también para la expresión de genes en las células cultivadas o en la terapia génica.

En la actualidad, muchos vectores diferentes se encuentran en uso experimental, tanto para la vacunación como para la terapia génica, con el objetivo final de optimizar la eficacia y la seguridad para la aplicación clínica (vacunología y terapia génica) o para la biotecnología (transferencia génica en el cultivo de células).

Resulta frecuente observar que los vectores tienden a compartir rasgos generales del organismo, p. ej., virus, de los cuales proceden. Por lo tanto, la explotación de una nueva familia de virus para el diseño de vectores promete una nueva combinación de rasgos que puede conferir este nuevo tipo de vector con capacidades sin precedentes y las aplicaciones correspondientes en la aplicación biomédica. Sin embargo, el diseño de vectores necesita tener en cuenta el perfil de seguridad del organismo utilizado y debe surgir con una estrategia que indique cómo eliminar la posible patogenia del organismo de una manera que no interfiera con los rasgos deseables, tal como la capacidad  
35 inmunógena, para la administración como una vacuna.

Se sabe desde hace más de 70 años que los arenavirus en general y el virus de la coriomeningitis linfocítica (VCML) en particular desencadenan respuestas inmunitarias celular y humoral duraderas y extraordinariamente fuertes. Cabe destacar, sin embargo, que es mínima la inmunidad protectora mediante anticuerpos neutralizantes contra la glucoproteína (GP) de la envoltura del virus, lo que significa que la infección da lugar, en el mejor de los casos, a una protección mínima mediada por anticuerpos contra la reinfección. También se ha establecido firmemente durante décadas que debido a su naturaleza no citolítica (que no destruye las células), los arenavirus pueden, en determinadas condiciones, mantener la expresión del antígeno a largo plazo en los animales sin desencadenar la enfermedad. Recientemente se han descrito sistemas de genética inversa para manipular el genoma infeccioso de los arenavirus (L. Flatz, A. Bergthaler, J. C de la Torre, y D. D. Pinschewer, *Proc. Natl. Acad Sci USA* 103: 4663-4668, 2006; A. B. Sanchez y J. C. de la Torre, *Virology*, 350: 370, 2006), pero hasta ahora los arenavirus no se han explotado como vectores para vacunación. Los mayores responsables son dos obstáculos importantes: i) los arenavirus pueden ocasionar una infección abrumadora que luego puede dar lugar a una enfermedad grave e inmunodepresión; ii) no se han podido incorporar antígenos foráneos de elección.

**Compendio de la invención**

50 La invención se refiere a una partícula infecciosa de arenavirus que se manipula genéticamente para que contenga un genoma con la capacidad de amplificar y expresar su información genética en las células infectadas, pero que sea incapaz de producir una progenie de partículas infecciosas cuando se replica en las células normales sin manipulación genética.

Más específicamente, la invención se refiere a tales partículas de arenavirus que comprenden otros ácidos

ribonucleicos que codifican proteínas de interés o que modulan la expresión génica del hospedador.

Un arenavirus de la invención comprende un genoma modificado, en donde

- 5 i) se han eliminado o mutado uno o más de los cuatro marcos abiertos de lectura del arenavirus correspondientes a glucoproteína (GP), nucleoproteína (NP), proteína Z de la matriz y ARN polimerasa L dependiente de ARN para impedir la propagación de la infectividad en las células normales, pero que todavía permite la expresión génica en tales células;
- 10 ii) se introducen ácidos ribonucleicos foráneos que codifican una o más proteínas o que modulan la expresión génica del hospedador y se transcriben desde uno o varios de los cuatro promotores del arenavirus en 5' UTR y 3' UTR del segmento S, y en 5' UTR y 3' UTR del segmento L, o de otros promotores introducidos que es capaz de leer la ARN polimerasa vírica dependiente del ARN, o que es capaz de leer la ARN polimerasa I celular, ARN polimerasa II celular o ARN polimerasa III celular, respectivamente, y en donde los ácidos ribonucleicos que codifican las proteínas o que modulan la expresión génica del hospedador se transcriben por sí solos o por la lectura completa de una fusión con un marco abierto de lectura de una proteína del arenavirus; y opcionalmente
- 15 iii) en la secuencia del transcrito vírico se introducen uno o más sitios internos de entrada del ribosoma para reforzar la expresión de proteínas en la célula infectada por el arenavirus.

La invención se refiere adicionalmente a vacunas y preparaciones farmacéuticas que comprenden tales arenavirus manipulados genéticamente, y a los procedimientos de vacunación y la terapia génica que utiliza estos arenavirus manipulados genéticamente.

- 20 La invención se refiere adicionalmente a la expresión de una proteína de interés en un cultivo celular o a la modulación de la expresión génica en un cultivo celular, en donde el cultivo celular está infectado con arenavirus manipulados genéticamente.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1

- 25 Debido a los cambios hechos al genoma del arenavirus de tipo silvestre, los vectores arenavíricos derivados se replican sólo en las células para complementación.

A: los vectores arenavíricos (1) pueden infectar las células normales (2) o las células para complementación (células-C, 3). Tras la infección de las células-C se forma una progenie adicional de vectores infecciosos, mientras que la infección de las células normales o bien no produce ninguna partícula de vector o bien produce partículas no infecciosas.

- 30 B: las células-C (1) y las células normales (2) se infectaron con un vector basado en el VCML (rVCML/GFP) que expresa la proteína fluorescente verde (GFP, por su nombre en inglés) en vez de VCML-GP, y muestras de sobrenadante recogido en distintos puntos temporales (3, dados en horas). La infectividad del sobrenadante (4, dada como UFP/ml) se determinó en un ensayo de formación de focos.

- 35 C: el genoma del arenavirus de tipo silvestre consiste en un segmento grande (L, 1) y uno pequeño (S; 2). El segmento L expresa los genes de L (3) y Z (4), mientras que el segmento S lleva los genes de NP (5) y GP (6). Una estrategia para generar un vector arenavírico incapaz de replicarse puede ser la sustitución del gen GP por los genes de interés, por ejemplo, GFP (7) u ovalbúmina (OVA, 8).

Figura 2

- 40 Organización esquemática del plásmido para complementación (plásmido-C), de los plásmidos para la expresión intracelular de los factores de acción en trans (plásmidos-FAT) y de los plásmidos para la expresión intracelular de los segmentos del genoma del vector arenavírico (plásmidos-SG).

A: ejemplo de un plásmido-C.

B: ejemplos de plásmidos-FAT que expresan la proteína vírica NP y L, respectivamente.

C: ejemplos de plásmidos-SG que expresan los segmentos S y L del vector arenavírico, respectivamente.

- 45 1: promotor de la polimerasa II; 2: gen vírico a expresar por complementación; 3: sitio interno de entrada del ribosoma; 4: marcador de selección de mamífero, tal como el gen de resistencia a la puomicina; 5: señal de poliadenilación; 6: casete de resistencia a la ampicilina; 7: origen de replicación; 8: factor vírico de acción en trans, p. ej., ORF de NP; 9: factor vírico de acción en trans, p. ej., ORF de L; 10: promotor que impulsa la expresión del segmento del genoma de arenavirus en las células-C, p. ej., promotor de la polimerasa I; 11: 5'-UTR del segmento S;
- 50 12: antígeno de interés; 13: IGR del segmento S; 14: gen NP; 15: 3'-UTR del segmento S; 16: terminador de la

polimerasa I; 17: 5'-UTR del segmento L; 18: gen Z; 19: IGR del segmento L; 20: gen L; 21: 3'-UTR del segmento L.

Figura 3

Los vectores arenavíricos se eliminan al cabo de unos días tras la inoculación, y de acuerdo con esto no provocan la inmunodepresión en los destinatarios de la vacuna.

5 A: el día 0, los ratones se inmunizaron por vía intravenosa con rVCML/GFP (1). En diferentes puntos temporales a partir de entonces (2; dados en días), se midieron las copias del genoma vírico (3; dado en forma de  $\log_{10}$ ) en el bazo.

B: como inmunización/infección primaria (1<sup>o</sup>), los ratones se inmunizaron con rVCML/OVA (5) o se dejaron sin infectar (6) o se infectaron con el tipo silvestre del VCML (7). El día 20, a todos los ratones se les dio una infección intraperitoneal (2<sup>o</sup>) con el virus de la estomatitis vesicular (VEV, 8). Posteriormente se recogió sangre para medir la respuesta de linfocitos T antivector y antiviral (3) y la respuesta con anticuerpos antivíricos (4). El día 28, los linfocitos T CD8+ específicos de H-2K<sup>b</sup>-SIINFEKL (epítipo de linfocito T CD8+ procedente de ovalbúmina) (9) y los linfocitos T CD8+ específicos de H-2K<sup>b</sup>-VSV-NP52-29 (epítipo de linfocito T CD8+ procedente de VSV-NP) (10) se midieron en la sangre periférica mediante la tinción intracelular del interferón y tras la reestimulación peptídica (los valores indican el porcentaje de células específicas entre los linfocitos T CD8+). El día 27 (indicado como «d7» que hace referencia al momento temporal tras la infección con el VEV), el día 29 (indicado como «d9») y el día 61 (indicado como «d41») se analizó el suero para encontrar los anticuerpos neutralizantes totales contra el VEV (11) y para la IgG resistente al  $\beta$ -mercaptoetanol (12) en un ensayo de reducción del 50% en placa (valores dados como  $-\log_2$  de un suero prediluido 40 veces).

20 Figura 4

Los vectores arenavíricos desencadenan con mucha frecuencia linfocitos T CD8+ de memoria duraderos y anticuerpos de memoria duraderos en títulos elevados.

A: se inmunizaron ratones con rVCML/OVA y se recogieron las muestras de sangre en el tiempo (2; dados en días) para medir la frecuencia de linfocitos T CD8+ específicos de H2K<sup>b</sup>-OVA/SIINFEKL utilizando tetrámeros del CMH de clase I (3; los valores indican la frecuencia de los linfocitos T CD8+ que expresan tetrámeros dentro del compartimento celular de los linfocitos T CD8+).

B: se inmunizaron ratones con rVCML/OVA a la dosis indicada (1), bien por vía subcutánea (s.c.) o por vía intravenosa (i.v.), y se midió la IgG específica contra OVA en el suero mediante ELISA el día 14 (5) y el día 58 (6). Los valores se expresan como la dilución de suero que produce mediciones que duplican la densidad óptica (DO) de fondo.

Figura 5

Los vectores arenavíricos no provocan enfermedades del sistema nervioso central

Se inmunizaron ratones por vía intracerebral con rVCML/OVA (cuadrados huecos) o con VCML de tipo silvestre (círculos rellenos) y se midieron en los puntos temporales indicados (1, indicados en días) los signos clínicos de la coriomeningitis terminal. Para cada punto temporal se muestra el número de animales sanos por número de animales analizados (2).

Figura 6

Los vectores arenavíricos confieren protección mediada por anticuerpos y por linfocitos T contra la exposición infecciosa.

40 A) El día 0 del experimento, los ratones se vacunaron con rVCML/OVA (grupo AA) o bien con un vector de rVCML de control que expresa el antígeno irrelevante de la recombinasa Cre como control negativo (grupo BB). La exposición intravenosa con *Listeria monocytogenes* recombinante que expresaba OVA se realizó tras un intervalo de bien 16 o bien 58 días (d16, d58). Cuatro días tras la exposición, se midieron los títulos bacterianos (1) en el bazo de los animales (representados en forma de logaritmo decimal de las unidades formadoras de colonias por órgano). Los círculos negros indican el valor para cada uno de los ratones. Las líneas verticales indican el valor medio de cada grupo.

B) Los ratones sin el receptor de interferón de tipo I se vacunaron (cuadrados rellenos) con un vector de VCML que expresa una variante antigénica, pero que no es funcional, de la proteína G de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular (modificada mediante inserción de una secuencia peptídica foránea en su ectodominio) o se dejaron sin vacunación (círculos huecos). Un mes después, todos los ratones se expusieron por vía intravenosa con  $2 \times 10^6$  UFP de virus de la estomatitis vesicular. En los puntos temporales indicados después de la exposición (2, indicado en días), se midieron los signos clínicos de la mieloencefalitis terminal en los animales. A cada punto temporal y

grupo se le se indica la supervivencia sana como el número de animales sanos por número de animales analizados (3).

### Descripción detallada de la invención

5 La invención se refiere a partículas infecciosas del arnavirus, denominadas vectores arenavíricos, que están manipuladas genéticamente para que contengan un genoma con la capacidad de amplificar y expresar su información genética en las células infectadas, pero que sea incapaz de producir una progenie de partículas infecciosas en las células normales sin ninguna manipulación genética. Este principio se muestra esquemáticamente en la figura 1A. Los datos del ejemplo se presentan en la figura 1B.

10 Para que los vectores arenavíricos se repliquen, se necesitan células manipuladas genéticamente que complementen el vector incapaz de replicarse. Tras la infección de una célula, el genoma del vector arenavírico expresa no sólo proteínas del arnavirus, sino también otras proteínas de interés, por ejemplo, antígenos de interés. Los vectores arenavíricos se producen mediante técnicas estándares de genética inversa tal y como se describe para el VCML (L. Flatz, A. Bergthaler, J. C. de la Torre y D. D. Pinschewer, *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 4633-4668, 2006; A. B. Sanchez y J. C. de la Torre, *Virology*, 350: 370, 2006), pero su genoma está modificado de uno o más de 15 los siguientes modos, lo que da lugar a las características mencionadas más arriba:

- i) Se retiran o se mutan uno o varios, p. ej., dos, tres o cuatro, de los cuatro marcos abiertos de lectura del arnavirus (glucoproteína (GP); nucleoproteína (NP); la proteína Z de la matriz; la ARN polimerasa L dependiente de ARN) para impedir la formación de partículas infecciosas en las células normales a pesar de que todavía permiten la expresión génica en las células infectadas con el vector arenavírico.
- 20 ii) Se pueden introducir ácidos nucleicos foráneos que codifican una o varias proteínas. Alternativamente o además, los ácidos nucleicos foráneos podrían estar incorporados para modular la expresión génica del hospedador. Estos incluyen, pero sin limitarse a ellos, ARN ahorquillados pequeños (shRNA, por su nombre en inglés), ARN pequeños interferentes (siRNA, por su nombre en inglés), microARN (miRNA, por su nombre en inglés) y precursores de los mismos. Estos ácidos nucleicos foráneos se transcriben desde uno o varios, p. ej., dos o tres, de los cuatro promotores del arnavirus que están en 5'-UTR y 3'-UTR del segmento S, y en 5'-UTR y 3'-UTR del segmento L, o a partir de otras secuencias promotoras introducidas que pueden ser leídas por la ARN polimerasa vírica dependiente de ARN, por la ARN polimerasa I celular, la ARN polimerasa II celular o la ARN polimerasa III celular, tal como duplicaciones de las secuencias del promotor vírico que se encuentra de forma natural en las UTR víricas, el promotor del ARN ribosómico 28S, el promotor de la  $\beta$ -actina o el promotor del ARN ribosómico 5S, respectivamente. Los ácidos ribonucleicos que codifican proteínas o que modulan la expresión génica del hospedador se transcriben y se traducen por sí mismos o por la lectura completa de una fusión con marcos abiertos de lectura de proteínas del arnavirus, y se puede realzar la expresión de las proteínas en la célula hospedadora mediante la introducción en el lugar o lugares apropiados de la secuencia vírica del transcrito, uno o varios, p. ej., dos, 35 tres o cuatro, sitios internos de entrada del ribosoma.

«Que modula la expresión génica del hospedador» tal y como se ha de entender en la presente memoria se refiere a la reducción de la expresión de los genes del hospedador o a la potenciación de la misma, bien en todas las células sobre las que actúan selectivamente los vectores, o bien de una manera específica del tipo celular. Estas características deseables se pueden conseguir mediante la adaptación de la secuencia de ácido nucleico 40 incorporada en los vectores.

Los vectores arenavíricos se pueden utilizar para mejorar la vida y la salud en general, y para inmunizar (de una manera preventiva) o tratar (de una manera inmunoterapéutica) animales, entre ellos los humanos, en una serie de contextos que incluyen, pero sin limitarse a ellos,

- 45 i) infecciones que incluyen, pero sin limitarse a ellos, virus tales como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC), los virus de la gripe y el virus sincitial respiratorio (VSR), bacterias tales como micobacterias, *Haemophilus* spp. y *Pneumococcus* spp., y parásitos tales como plasmodios, amebas y filarias, y priones tales como los agentes infecciosos que ocasionan la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob clásica y variante, y la enfermedad de las vacas locas;
- 50 ii) enfermedades autoinmunitarias que incluyen, pero sin limitarse a ellas, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso y psoriasis;
- iii) enfermedades neoplásicas que incluyen, pero sin limitarse a ellas, melanoma, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de pulmón y neuroblastoma;
- iv) enfermedades metabólicas que incluyen, pero sin limitarse a ellas, diabetes de tipo 2, obesidad y gota;
- v) enfermedades degenerativas que incluyen, pero sin limitarse a ellas, enfermedad de Alzheimer y

enfermedad de Parkinson;

vi) enfermedades hereditarias que incluyen, pero sin limitarse a ellas, enfermedad de Huntington, inmunodeficiencia combinada grave y lipidosis;

vii) dependencias que incluyen, pero sin limitarse a ellas, tabaquismo y alcoholismo; y

5 viii) enfermedades alérgicas que incluyen, pero sin limitarse a ellas, rinoconjuntivitis estacional o perenne, asma o eccema.

Con la misma intención, los vectores arenavíricos se pueden utilizar para introducir un gen de interés, p. ej., ácidos nucleicos foráneos, en las células de animales vivos, incluidas las de humano, es decir, como terapia génica, o se pueden utilizar para introducir y expresar un producto génico de interés en las aplicaciones biotecnológicas. Al suprimir la capacidad de replicación de los vectores arenavíricos por haber eliminado de su genoma, p. ej., el gen Z que se necesita para la liberación de las partículas, o el gen GP que se necesita para la infección de las células diana (compárese también la figura 3), el número total de células infectadas está limitado por el inóculo administrado, p. ej., a un receptor de la vacuna o a un destinatario de la terapia génica, o si se transmite accidentalmente a personal implicado en las aplicaciones médicas o biotecnológicas o a los animales. Se sabe que tanto la enfermedad por arenavirus como la inmunosupresión debida a la infección por el arenavirus de tipo silvestre se producen por la falta de control sobre la replicación del virus. Por lo tanto, la eliminación de la replicación de los vectores arenavíricos impide que haya patogenicidad como resultado de la transmisión intencionada o accidental de las partículas de vector. En esta invención, un aspecto importante consiste en explotar la necesidad anterior de destruir la replicación de un modo beneficioso con el propósito de expresar una o más proteínas foráneas, p. ej., antígenos de interés. La retirada, p. ej., estructural por delección o funcional por mutagénesis, de uno o más genes del arenavirus libera a los correspondientes promotores víricos para que se puedan utilizar para expresar las proteínas de elección.

Una serie de ventajas combinadas caracterizan la presente invención con respecto a la estrategia mediante vector arenavírico. Cabe destacar que la retención de la delicada capacidad inmunógena de los vectores arenavíricos — conservada a pesar de que los vectores arenavíricos son incapaces de diseminarse— aparece como una gran sorpresa para los inmunólogos que trabajan en el campo de la inmunidad contra el arenavirus. Por lo general se considera que una carga antigénica y viral sustanciales durante un periodo de tiempo crítico es esencial para las propiedades inmunógenas histoincompatibles de los arenavirus. Respecto a la seguridad, el comportamiento no citolítico del virus (y del vector) es una ventaja importante sobre la mayoría de los sistemas de vectores disponibles, y lo mismo se aplica a la ausencia de potencial oncogénico de los arenavirus en general. De igual forma, que los vectores arenavíricos sean incapaces de replicarse tiene mucha importancia con relación a la seguridad. También resulta muy ventajoso, en particular para la aplicación como vacuna, el elevado nivel de resistencia de los vectores arenavíricos a la neutralización mediante anticuerpos. Esta propiedad es inherente a muchas envolturas de arenavirus y permite repetir la inmunización con el mismo vector arenavírico, lo que da lugar a la repetición de la estimulación de la respuesta inmunitaria. De igual forma, la inmunidad preexistente contra los arenavirus es muy baja o escasa en la población humana.

Los arenavirus considerados son virus del viejo mundo, por ejemplo, virus de Lassa, virus de la coriomeningitis linfocítica (VCML), virus de Mobala, virus de Mopeia o virus de Ippy, o virus del nuevo mundo, por ejemplo, virus de Amapari, virus de Flexal, virus de Guanarito, virus de Junin, virus Latino, virus de Machupo, virus de Oliveros, virus de Paraná, virus de Pichinde, virus de Pirital, virus de Sabiá, virus de Tacaribe, virus de Tamiami, virus del Cañón del Oso, o virus del Arroyo Whitewater. Los preferidos son miembros de los virus del viejo mundo, p. ej., virus de Lassa o VCML, en particular el VCML.

Los ácidos nucleicos foráneos que codifican una o más proteínas de interés son, p. ej., secuencias procedentes de ARN mensajero o ARN que corresponde a un transcrito génico primario, que impulsan a la expresión de la proteína de interés cuando las partículas del arenavirus de la invención que llevan este ARN infectan una célula. Otros ácidos nucleicos foráneos que se consideran son los que modifican la expresión génica en las células infectadas con la partícula de vector arenavírico, p. ej., mediante interferencia por ARN.

Los ácidos ribonucleicos de interés que se considera que hay que introducir en los arenavirus manipulados genéticamente de la invención son toda secuencia que codifica una proteína o que modula la expresión génica del hospedador y que se puede introducir en un genoma de vector arenavírico mediante el reemplazo o fusión al marco abierto de lectura de la glucoproteína GP, de la proteína Z de la matriz, de la nucleoproteína NP o de la proteína polimerasa L, a saber, que se puede transcribir y/o expresar bajo el control de los cuatro promotores de arenavirus (5'-UTR y 3'-UTR del segmento S, y 5'-UTR y 3'-UTR del segmento L), así como los ácidos ribonucleicos que se pueden insertar con elementos reguladores que pueden ser leídos por la ARN polimerasa vírica dependiente del ARN, por la ARN polimerasa I celular, por la ARN polimerasa II celular o por la ARN polimerasa III celular, tal como duplicaciones de las secuencias promotoras víricas que se encuentran de forma natural en las UTR víricas, el promotor del ARN ribosómico 28S, el promotor de la  $\beta$ -actina o el promotor del ARN ribosómico 5S, respectivamente. Las proteínas o ácidos nucleicos se transcriben y/o expresan por sí mismos o mediante la lectura completa de una fusión con marcos abiertos de lectura y genes del arenavirus, respectivamente, y/o en combinación con uno o varios,

p. ej., dos, tres o cuatro, sitios internos de entrada del ribosoma. Como se demuestra con los genes para GFP y la ovalbúmina cuando reemplazan la GP, no son decisivas ni la longitud del gen insertado ni las propiedades de la proteína expresada, y abren la posibilidad de expresar una gran variedad de proteínas de interés.

5 Las proteínas de interés preferidas son antígenos peptídicos o proteínicos. Los antígenos peptídicos o proteínicos de la invención pueden, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste en (a) proteínas o péptidos que son adecuados para inducir o modular una respuesta inmunitaria contra enfermedades infecciosas; (b) las proteínas o péptidos que son adecuados para inducir o modular una respuesta inmunitaria contra enfermedades neoplásicas, a saber, células cancerosas; y (c) proteínas o péptidos que son adecuados para inducir o modular una respuesta inmunitaria contra alérgenos. Las combinaciones de antígenos, p. ej., de antígenos procedentes de uno o varios  
10 organismos infecciosos o tumores o de alérgenos, se pueden combinar para desencadenar o modular una respuesta inmunitaria que protege o cura más de una infección, tipo de tumor o enfermedad alérgica, respectivamente.

«Modular una respuesta inmunitaria» tal y como se utiliza en la presente memoria significa i) mejorar, bien en calidad o bien cantidad, una respuesta inmunitaria beneficiosa para un paciente. Esto es deseable, por ejemplo, cuando se realza la respuesta de anticuerpos y de linfocitos T específicos contra el VIH en el contexto de la  
15 inmunoterapia de un individuo infectado. La terminología «modular una respuesta inmunitaria» también se refiere a ii) el proceso conocido de forma general como desensibilización, p. ej., desensibilización contra alérgenos al suprimir un tipo alérgico de respuesta inmunitaria, tal como la del isotipo de inmunoglobulina E, con el intento de sustituir o superponer una respuesta inmunitaria protectora o de suprimir la respuesta inmunitaria patógena.

20 En una realización específica de la invención, el antígeno es uno que es útil para la prevención de una enfermedad infecciosa. Ejemplos concretos de antígenos o determinantes antigénicos incluyen los antígenos del VIH gp41, gp 120, gag, y pol, proteínas no estructurales (NS) del virus de la hepatitis C, antígenos de la gripe —hemaglutinina y neuraminidasa—, antígeno de superficie de la hepatitis B y proteína del circunsporozoíto del paludismo.

Preferiblemente, el antígeno se selecciona entre antígenos del virus sincitial respiratorio, antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana, antígenos del virus de la hepatitis C, antígenos del virus de la varicela zóster, antígenos  
25 del virus del herpes simple, antígenos del citomegalovirus y antígenos procedentes de *Mycobacterium tuberculosis*.

La selección de antígenos para la composición y el procedimiento para tratar el cáncer los deberían conocer los expertos en la técnica médica que trata tales trastornos. Ejemplos representativos de este tipo de antígeno incluyen los siguientes: HER2/neu (cáncer de mama), GD2 (neuroblastoma), EGF-R (glioblastoma maligno), CTM (cáncer tiroideo medular), CD52 (leucemia), MUC1 (expresado en neoplasias hemáticas), proteína gp100, MELAN-A/MART1  
30 o el producto del gen supresor de tumores WT1.

La selección de antígenos para la composición y el procedimiento de tratamiento para la alergia los deberían conocer los expertos en la técnica médica que trata tales trastornos. Ejemplos representativos de este tipo de antígeno incluyen, pero sin limitarse a ellos, el antígeno del polen de abedul Bet v 1 y el alérgeno de gato Fel d 1.

35 La selección de antígenos para la composición y el procedimiento de tratamiento de la obesidad los deberían conocer los expertos en la técnica médica que trata tales trastornos. Ejemplos representativos de este tipo de antígeno incluyen, pero sin limitarse a ellos, la grelina y el péptido inhibidor gástrico (GIP, por su nombre en inglés).

#### Diseño del genoma del vector arenavírico

Se comienza con un genoma de arenavirus de tipo silvestre (figura 1C), y el genoma del vector arenavírico se diseña para que conserve al menos los elementos reguladores esenciales en las regiones sin traducir (UTR, por su nombre  
40 en inglés) en 5' y 3' de ambos segmentos, y preferiblemente también las regiones intergénicas (IGR, por su nombre en inglés). Los factores de acción en trans mínimos que se necesitan para la expresión génica en las células infectadas permanecen en el genoma del vector como marcos abiertos de lectura que se pueden expresar, aunque se pueden colocar de modo diferente en el genoma y se pueden colocar bajo el control de un promotor diferente del que tienen en la naturaleza, o se pueden expresar desde sitios internos de entrada del ribosoma. Se ha eliminado o está inactivado funcionalmente al menos uno de los cuatro genes víricos (NP, L, GP, Z). Uno o varios genes más, o  
45 tramos de ácidos nucleicos de interés, se insertan en el genoma del vector arenavírico, se colocan y se orientan para permitir que se expresen en las células infectadas, bien bajo el control de uno de los cuatro promotores víricos (en 5' y 3' UTR del segmento S, en 5' y 3' UTR del segmento L), o desde un sitio interno de entrada del ribosoma, o desde promotores que pueden ser leídos por la ARN polimerasa vírica dependiente de ARN, por la ARN polimerasa  
50 I celular, por la ARN polimerasa II celular o por la ARN polimerasa III celular. La figura 1C muestra un ejemplo en el que el marco abierto de lectura (ORF, por su nombre en inglés) de la GP del arenavirus está reemplazado por un ORF de la ovalbúmina (OVA) o de la proteína fluorescente verde (GFP, por su nombre en inglés).

#### Generación de una línea celular para complementación

Debido a la «delección» (que se refiere o bien a la retirada o bien la inactivación funcional) de uno o varios de los  
55 genes víricos en los vectores arenavíricos (aquí se tomará como ejemplo la delección de la glucoproteína, GP), los

vectores arenavíricos se deben generar y expandir en las células que proporcionan en trans el o los genes víricos eliminados, p. ej., la GP en el presente ejemplo. Tal línea celular para complementación, de aquí en adelante se nombrará como células-C, se genera por transfección de una línea de células de mamífero, tal como BHK-21, HEK293, VERO u otra (aquí se tomará como ejemplo BHK-21) con uno o varios plásmidos para la expresión del gen o de los genes víricos de interés (plásmido para complementación, denominado plásmido-C). El plásmido-C o plásmidos-C (como ejemplo, véase la figura 2A) expresa el gen o los genes víricos eliminados en el vector arenavírico que se generará bajo el control de uno o varios casetes de expresión adecuados para la expresión en las células de mamífero, p. ej., un promotor de la polimerasa II de mamífero, tales como el promotor del CMV o del EF1 $\alpha$ , con una señal de poliadenilación. Además, el plásmido para complementación se caracteriza por tener un marcador de selección de mamífero, p. ej., resistencia a la puromicina, bajo el control de un casete de expresión adecuado para la expresión génica en las células de mamífero, p. ej., casete de expresión de la polimerasa II como más arriba, o el o los transcritos del o de los genes víricos van seguidos por un sitio interno de entrada del ribosoma, tal como el del virus de la encefalomiocarditis, seguido por el marcador de resistencia para mamíferos. Para la producción en *E. coli*, el plásmido se caracteriza por tener adicionalmente un marcador de selección bacteriano, tal como un casete de resistencia a la ampicilina.

Las células a utilizar, p. ej., BHK-21, HEK293, MC57G u otra, se mantienen en el cultivo y se transfectan con el plásmido o plásmidos para complementación mediante el uso de alguna de las estrategias utilizadas con frecuencia, tal como los protocolos basados en fosfato de calcio, en liposomas, o por electroporación. Unos pocos días después, el agente de selección adecuado, p. ej., puromicina, se añade en concentraciones conocidas. Los clones supervivientes se aíslan y se subclonan siguiendo los procedimientos estándares, y los clones de células-C que se expresan mucho se identifican mediante procedimientos de inmunotransferencia Western o de citometría de flujo con anticuerpos dirigidos contra la proteína o proteínas víricas de interés. Como alternativa al uso de células-C transfectadas de forma estable, la transfección transitoria de células normales puede complementar el gen o genes víricos ausentes en cada una de las etapas donde las células-C se utilizarán a continuación.

#### 25 Plásmidos para la recuperación de los vectores arenavíricos

Los plásmidos necesarios son de dos tipos:

- i) Dos plásmidos, denominados plásmidos-FAT (como ejemplo, véase la figura 2B), para la expresión intracelular en las células-C de los factores de acción en trans mínimos del arenavirus del que procede el vector, p. ej., las proteínas NP y L del VCML en el presente ejemplo.
- 30 ii) Plásmidos, denominados plásmidos-SG (como ejemplo, véase la figura 2C), para la expresión intracelular en las células-C de los segmentos del genoma del vector arenavírico, p. ej., los segmentos con las modificaciones diseñadas tal y como se describe en la figura 1C. Los plásmidos-FAT expresan las proteínas NP y L del vector arenavírico correspondiente bajo el control de un casete de expresión adecuado para la expresión de proteínas en las células de mamífero, típicamente, p. ej., un promotor de la polimerasa II de mamífero tal como el promotor del CMV o del EF1 $\alpha$ , cualquiera de ellos preferiblemente en combinación con una señal de poliadenilación (figura 2B). Los plásmidos-SG expresan los segmentos pequeño (S) y grande (L) del genoma del vector. Típicamente se pueden utilizar los casetes de expresión impulsados por la polimerasa I (figura 2C) o los casetes de expresión dirigidos por la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (T7), este último preferiblemente con una ribozima en el extremo 3' para procesar el transcrito primario para producir el extremo correcto. En el caso de utilizar un sistema basado en T7, la expresión de T7 en las células-C debe proporcionarse bien por la inclusión, en el proceso de recuperación, de otro plásmido de expresión más construido de forma análoga a los plásmidos-FAT, por el aporte de T7, o la construcción de las células-C que expresan adicionalmente T7 de una manera estable.

#### Recuperación del vector arenavírico

45 Primer día: las células-C, típicamente a una confluencia del 80% en las placas M6 con pocillos, se transfectan con una mezcla de los dos plásmidos-FAT más los dos plásmidos-SG. Para ello se puede explotar alguna de las estrategias utilizadas de forma habitual, tal como los protocolos basados en fosfato de calcio, en liposomas o por electroporación.

3-5 días después: se recoge el sobrenadante del cultivo (preparación del vector arenavírico), se distribuye en alícuotas y se conserva a 4 °C, -20 °C o -80 °C según el tiempo que el vector arenavírico va a estar almacenado antes de su uso. A continuación, la titulación infecciosa de la preparación del vector arenavírico se valora mediante un ensayo de inmunoenfoque sobre las células-C.

#### Titulación de la infectividad del vector arenavírico

Para medir la infectividad de una preparación de vector arenavírico se utilizan las células-C para un ensayo de inmunoenfoque típico siguiendo los principios utilizados de forma habitual en virología, como se esboza a continuación:

Monocapas de células-C, típicamente en placas M24 con pocillos, a una confluencia del 80%, se infectan durante 90 min con diluciones de 10 veces de la preparación del vector arenavírico. Posteriormente, la capa de células se recubre con el medio de cultivo celular adecuado complementado con metilcelulosa al 1%. De dos a tres días después, según la permisividad de la línea de células-C utilizada, se retira el sobrenadante del cultivo, se fija la capa celular, típicamente con etanol/acetona o con formol al 4%, y luego se permeabiliza la capa de células con detergentes suaves. Posteriormente, los focos de células infectadas con el vector arenavírico se identifican mediante preparaciones de anticuerpos mono- o policlonales contra una de las proteínas del vector arenavírico a analizar o contra el antígeno introducido. El anticuerpo fijado se detecta con los reactivos apropiados, tales como anticuerpos antiisotipo o antiespecie que están conjugados a un sistema para la visualización, tal como la peroxidasa de rábano picante, seguido por una reacción colorimétrica con los cromógenos adecuados tal como o-fenilendiamina. Se cuentan los puntos que aparecen en la placa para calcular el número de unidades formadoras de focos (UFF) infecciosos por volumen de preparación del vector arenavírico.

#### Vacunas y preparaciones farmacéuticas

La invención se refiere adicionalmente a vacunas y preparaciones farmacéuticas que comprenden los arenavirus manipulados genéticamente como se ha descrito más arriba en el texto. Las vacunas y preparaciones farmacéuticas para otros usos se preparan de acuerdo con los procedimientos estándares en la técnica.

Se prefieren composiciones para la administración entérica, tal como la administración nasal, oral, rectal u vestibular, y para la administración parenteral, tal como la administración intravenosa, intramuscular, intradérmica o subcutánea, a animales homeotermos, especialmente humanos. Particularmente preferidas son las composiciones para la administración parenteral. Las composiciones comprenden los arenavirus manipulados genéticamente solos o, preferiblemente, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La dosificación del ingrediente activo depende del tipo de vacunación y de la enfermedad a tratar, y por encima de la especie, su edad, peso y estado patológico, los datos farmacocinéticos individuales y el modo de administración.

Las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente  $10^3$  a aproximadamente  $10^{11}$  unidades formadoras de focos de los arenavirus manipulados genéticamente. Las formas de dosis unitarias para la administración parenteral son, por ejemplo, ampollas o viales, p. ej., viales que contienen de aproximadamente  $10^3$  a  $10^{10}$  unidades formadoras de focos o de  $10^5$  a  $10^{15}$  partículas físicas de arenavirus manipulados genéticamente.

Se da preferencia al uso de suspensiones o dispersiones de arenavirus manipulados genéticamente, en especial a las dispersiones o suspensiones acuosas isotónicas. Las composiciones farmacéuticas se pueden esterilizar y/o pueden comprender excipientes, p. ej., conservantes, estabilizantes, humectantes y/o emulsionantes, solubilizantes, sales para regular la presión osmótica y/o tamponantes, y se preparan de una manera conocida de por sí, por ejemplo, por medio de procesos de suspensión y dispersión convencionales. Las dichas dispersiones o suspensiones pueden comprender reguladores de la viscosidad. Las suspensiones o dispersiones se mantienen a una temperatura en torno a  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , o preferiblemente, para la conservación a más largo plazo, se pueden congelar y a continuación descongelar poco antes de su uso.

La invención se refiere también a los procedimientos y al uso de arenavirus manipulados genéticamente para fabricar vacunas en forma de preparaciones farmacéuticas, que comprenden arenavirus manipulados genéticamente como ingrediente activo. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se preparan de una manera conocida de por sí, por ejemplo, por medio de procedimientos de dispersión y/o mezcla convencionales.

40 Administración al receptor de la vacuna y al destinatario de la terapia génica

La invención se refiere adicionalmente a los procedimientos de vacunación y de terapia génica que utilizan los arenavirus manipulados genéticamente como se describe más arriba en el texto.

Los vectores arenavíricos se administran para mejorar la calidad de vida, lo que incluye, pero sin limitarse a ellas, vacunación, inmunoterapia y terapia génica para prevenir, tratar o mejorar

45 i) infecciones que incluyen, pero sin limitarse a ellas, las ocasionadas por virus, tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC), los virus de la gripe y el virus sincitial respiratorio (VSR), por bacterias tales como micobacterias, *Haemophilus* spp., y *Pneumococcus* spp., por parásitos tales como plasmodios, amebas y filarias, y por priones tales como agentes infecciosos que ocasionan la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob clásica y variante y la enfermedad de las vacas locas;

50

ii) enfermedades autoinmunitarias que incluyen, pero sin limitarse a ellas, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso y psoriasis;

iii) enfermedades neoplásicas que incluyen, pero sin limitarse a ellas, melanoma, carcinoma de próstata, carcinoma de mama, carcinoma de pulmón y neuroblastoma;

- iv) enfermedades metabólicas que incluyen, pero sin limitarse a ellas, diabetes de tipo 2, obesidad y gota;
- v) enfermedades degenerativas que incluyen, pero sin limitarse a ellas, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson;
- 5 vi) enfermedades hereditarias que incluyen pero sin limitarse a ellas, enfermedad de Huntington, inmunodeficiencia grave combinada y lipidosis; y
- vii) dependencias que incluyen, pero sin limitarse a ellas, tabaquismo y alcoholismo.

En particular, la invención se refiere a un procedimiento para prevenir infecciones por virus, bacterias, parásitos y priones que comprende la administración de una vacuna que comprende arenavirus manipulados genéticamente a un paciente que lo necesita, y así mismo a un procedimiento para impedir las enfermedades neoplásicas y las enfermedades degenerativas que se recogen más arriba en el texto.

Además, la invención se refiere a un procedimiento para tratar infecciones por virus, bacterias, parásitos y priones, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades neoplásicas, enfermedades metabólicas, enfermedades degenerativas, enfermedades hereditarias o toxicomanías, que comprende la administración a un paciente que lo necesita de una preparación farmacéutica que comprende arenavirus manipulados genéticamente.

15 Los vectores arenavíricos se administran a un receptor de la vacuna bien mediante una o mediante varias vías de administración entre las disponibles, que incluyen, pero sin limitarse a ellas, las vías intramuscular, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal o intravenosa, p. ej., en el experimento esquematizado en la figura 3A. Esto da lugar a la infección de células, amplificación de los segmentos del genoma vírico en estas mismas células infectadas inicialmente, p. ej., tras la inoculación intravenosa. Esto comprende células dendríticas del bazo que pueden desencadenar respuestas de linfocitos T. Debido a la incapacidad del vector arenavírico para replicarse en las células de un receptor de la vacuna, que carece de la proteína vírica para complementación presente en las células-C, la cantidad de ARN del vector arenavírico desciende rápidamente con el tiempo y el genoma vírico se acerca su desaparición al cabo de unos días tras la inoculación del vector arenavírico (figura 3A). Debido a que el vector arenavírico es incapaz de replicarse y de persistir, y a diferencia de la infección con la misma dosis del virus del tipo silvestre, la inmunización con el vector arenavírico no ocasiona inmunosupresión (figura 3B) ni enfermedad (figura 5). Esto se comprueba en los ratones infectados bien con el VCML de tipo silvestre o bien con el vector basado en el VCML que expresa la OVA en vez de VCML-GP (rVCML/OVA; compárese la figura 1C). La infección posterior con el virus de la estomatitis vesicular desencadenó una respuesta de anticuerpos y de linfocitos T CD8 normal en los animales previamente inmunizados con rVCML/OVA, pero se suprimió en los animales que se habían infectado antes con el VCML de tipo silvestre. De igual forma, el VCML de tipo silvestre desencadenó la coriomeningitis mortal en los ratones cuando fue administrado por vía intracraneal, pero el rVCML/OVA no desencadenó ningún signo clínicamente detectable del cuadro clínico (figura 5).

A pesar de su naturaleza transitoria, la expresión del antígeno de interés provoca, sin embargo, una respuesta de linfocitos T fuerte y duradera (figura 4A) y provoca títulos altos de anticuerpos específicos (figura 4B). Esta respuesta es dependiente de la dosis, pero incluso las dosis pequeñas son eficaces (figura 4B). En los ratones se analiza la capacidad protectora de las respuestas de linfocitos T desencadenadas por los vectores para vacuna basados en el VCML. La inmunización con rVCML/OVA protegió contra la exposición infecciosa con *Listeria monocytogenes* recombinante que expresa OVA (rLM/OVA). Esto resultó manifiesto por los títulos de rLM/OVA indetectables o fuertemente reducidos en el bazo de los animales vacunados (figura 6A). La inducción de la protección mediada por anticuerpos mediante el vector del VCML se comprueba en los ratones que carecen del receptor del interferón de tipo I. Estos ratones son muy susceptibles al virus de la estomatitis vesicular (VEV), con una dosis mortal del 50% (DM<sub>50</sub>) en el intervalo de 50 UFP. Para la inmunización contra el VEV, se utilizó un vector de VCML que expresa una variante antigénica, pero no funcional, de la proteína G de envoltura del virus de la estomatitis vesicular (modificada por la inserción de una secuencia peptídica foránea en su ectodominio). Los ratones inmunizados sobrevivieron a una infección de provocación con  $2 \times 10^6$  UFP del VEV (a saber, una DM<sub>50</sub> > 10.000 veces), mientras que los ratones de control sin inmunizar desarrollaron la mieloencefalitis terminal en menos de dos a tres días desde la exposición con el VEV (figura 6). Cabe destacar, sin embargo, que la inactivación del genoma del vector arenavírico mediante irradiación UV anuló su inmunogenia, lo que demuestra que la replicación y la expresión génica del vector vírico en las células infectadas es esencial para su eficacia como vacuna. Adicionalmente, las respuestas de anticuerpos y de linfocitos T se puede reforzar por repetición de las aplicaciones de los mismos (homólogos) o diferentes (heterólogos) vectores arenavíricos, a saber, en forma de una inmunización de refuerzo. En las posologías en las que la sensibilización de refuerzo es homóloga, la ausencia virtual de inducción de anticuerpos neutralizantes convierte a las inmunizaciones de refuerzo en particularmente eficaces.

15 Cuando se utilizan para la terapia génica, los vectores arenavíricos se pueden aplicar sistémicamente, p. ej., por vía intravenosa, o tópica, p. ej., mediante inyección estereotáctica con el equipo apropiado, para actuar selectivamente y administrar a tejidos específicos en donde se debe expresar el antígeno de interés. Debido a su naturaleza no citolítica, el vector arenavírico no daña la célula que infecta y puede hacer de sustituto funcional de un gen de interés.

Como modo alternativo de explotación de vectores arenavíricos para el tratamiento de organismos pluricelulares, las células para complementación (células-C) o que no complementan (normales) se implantan en el cuerpo de un paciente encapsuladas por materiales biocompatibles, lo cual impide el rechazo inmunitario del paciente, lo que permite la liberación constante de partículas infecciosas (implante de células-C infecciosas) o no infecciosas (implante de células normales infectadas) o de proteínas y/o ácidos ribonucleicos desde las células encapsuladas a través de la cápsula hacia los tejidos del paciente.

Expresión de una proteína de interés en un cultivo celular

La invención se refiere adicionalmente a la expresión de una proteína de interés en un cultivo celular, en donde el cultivo celular está infectado con arnavirus manipulados genéticamente. Cuando se utilizan para la expresión de una proteína o tramo de ácido nucleico de interés, p. ej., un antígeno de interés, en las células cultivadas, se contemplan los dos procedimientos siguientes:

- i) El tipo de célula de interés se infecta con la preparación del vector arenavírico a una multiplicidad de infección (MDI) de uno o varios, p. ej., dos, tres o cuatro, lo que da lugar a la producción de la proteína de interés en todas las células desde poco después de la infección.
- ii) Alternativamente, se puede utilizar una MDI menor y se pueden seleccionar clones celulares independientes por su nivel de expresión de proteínas codificadas por el virus. Posteriormente, cada uno de los clones se puede expandir infinitamente debido a la naturaleza no citolítica de los vectores arenavíricos. Independientemente de la estrategia, la proteína o proteínas de interés se pueden recoger posteriormente (y purificarse) bien desde el sobrenadante de cultivo o bien desde las propias células, según las propiedades de la proteína o proteínas producidas.

Sin embargo, la invención no se limita a estas dos estrategias y se pueden tener en cuenta otros modos de dirigir la expresión de proteínas o de ácidos nucleicos de interés mediante arnavirus manipulados genéticamente a modo de vectores.

25

30

## REIVINDICACIONES

1. Partícula de arnavirus infeccioso incapaz de replicarse manipulada genéticamente para que contenga un genoma con la capacidad de amplificar y expresar su información genética en las células infectadas con dicha partícula de arnavirus, pero incapaz de producir más partículas infecciosas de progenie en células que no complementan, en donde en dicha partícula de arnavirus se han eliminado o inactivado funcionalmente uno o más de los cuatro marcos abiertos de lectura del arnavirus que codifican glucoproteína (GP), nucleoproteína (NP), proteína Z de la matriz y ARN polimerasa L dependiente de ARN de dicho genoma de dicha partícula de arnavirus.
2. Partícula de arnavirus incapaz de replicarse de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende secuencias de ácido nucleico adicionales que codifican una proteína o péptido de interés.
3. Partícula de arnavirus incapaz de replicarse de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende secuencias de ácido nucleico adicionales que modulan la expresión génica del hospedador.
4. Partícula de arnavirus incapaz de replicarse de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en donde el genoma está modificado adicionalmente para
  - i) expresar secuencias de ácido ribonucleico foráneo que codifican una o varias proteínas de interés o adecuadas para modular la expresión génica del hospedador bajo el control de uno o más de los cuatro promotores de arnavirus en 5'-UTR y 3'-UTR del segmento S, y en 5'-UTR y 3'-UTR del segmento L, y/o bajo el control de elementos reguladores que pueden ser leídos por la ARN polimerasa vírica dependiente de ARN, por la ARN polimerasa I celular, por la ARN polimerasa II celular o por la ARN polimerasa III celular, en donde las secuencias de ácido ribonucleico foráneo se expresan bien por sí mismas o bien como producto de la lectura completa de una fusión con los marcos abiertos de lectura de las proteínas de arnavirus; y opcionalmente
  - ii) comprender uno o varios sitios internos de entrada del ribosoma para incrementar la expresión de las proteínas de interés en la célula infectada por el vector arnavírico.
5. Partícula de arnavirus incapaz de replicarse de acuerdo con la reivindicación 4, en donde se ha eliminado o se ha inactivado funcionalmente el marco abierto de lectura que codifica la glucoproteína (GP) .
6. Partícula de arnavirus incapaz de replicarse de acuerdo con la reivindicación 5, en donde se ha eliminado el marco abierto de lectura del arnavirus que codifica la glucoproteína (GP) y ha sido reemplazado por la secuencia de ácido ribonucleico foráneo que codifica una o varias proteínas de interés o que modulan la expresión génica del hospedador.
7. Partícula de arnavirus incapaz de replicarse de acuerdo con la reivindicación 5, en donde se ha eliminado el marco abierto de lectura del arnavirus que codifica la glucoproteína (GP) y se ha reemplazado por la secuencia de ácido ribonucleico foráneo que codifica antígenos peptídicos o proteicos procedentes de organismos infecciosos, de tumores o de alérgenos.
8. Partícula de arnavirus incapaz de replicarse de acuerdo con la reivindicación 5, en donde se ha eliminado el marco abierto de lectura del arnavirus que codifica la glucoproteína (GP) y se ha reemplazado por la secuencia de ácido ribonucleico foráneo seleccionada de ARN ahorquillado pequeño (shRNA), ARN pequeño interferente (siRNA) y microARN (miRNA).
9. Partícula de arnavirus incapaz de replicarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el arnavirus es el virus de la coriomeningitis linfocítica (VCML).
10. Partícula de arnavirus incapaz de replicarse de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende ácidos ribonucleicos foráneos que codifican un antígeno seleccionado de antígenos del virus sincitial respiratorio, antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana, antígenos del virus de la hepatitis C, antígenos del virus de la varicela zóster, antígenos del virus del herpes simple, antígenos del citomegalovirus y antígenos procedentes de *Mycobacterium tuberculosis*.
11. Vacuna que comprende una partícula de arnavirus incapaz de replicarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10.
12. Preparación farmacéutica que comprende una partícula de arnavirus incapaz de replicarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10.
13. Uso de una partícula de arnavirus incapaz de replicarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, para la fabricación de un fármaco para la prevención de infecciones por virus, bacterias, parásitos y priones, de enfermedades neoplásicas o de enfermedades degenerativas.
14. Partícula de arnavirus incapaz de replicarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, para

el uso en un procedimiento para la prevención de infecciones por virus, bacterias, parásitos y priones, enfermedades neoplásicas o enfermedades degenerativas.

15. Utilización de una partícula de arenavirus incapaz de replicarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, para la fabricación de un fármaco para el tratamiento de infecciones ocasionadas por virus, bacterias, parásitos y priones, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades neoplásicas, enfermedades metabólicas, enfermedades degenerativas, enfermedades hereditarias, enfermedades alérgicas o toxicomanías.
- 5
16. Partícula de arenavirus incapaz de replicarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, para el uso en el tratamiento de infecciones ocasionadas por virus, bacterias, parásitos y priones, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades neoplásicas, enfermedades metabólicas, enfermedades degenerativas, enfermedades hereditarias, enfermedades alérgicas o dependencias.
- 10
17. Procedimiento para expresar una proteína de interés o modificar la expresión génica en un cultivo celular, en donde el cultivo celular está infectado con una partícula de arenavirus incapaz de replicarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10.
18. Procedimiento para modificar la expresión génica en un cultivo celular, en donde el cultivo celular está infectado con una partícula de arenavirus incapaz de replicarse de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10.
- 15

Fig. 1

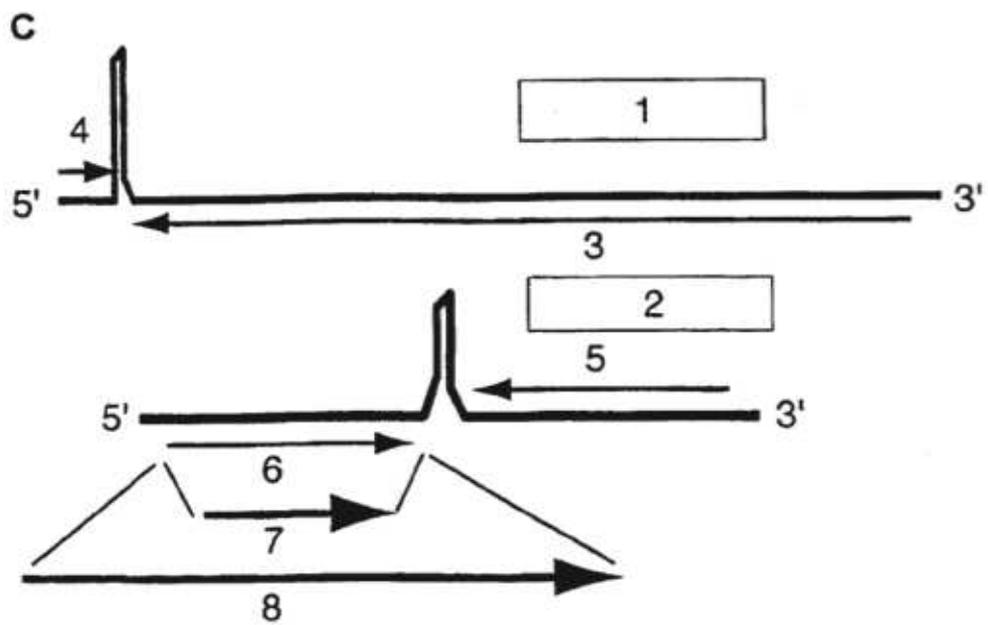
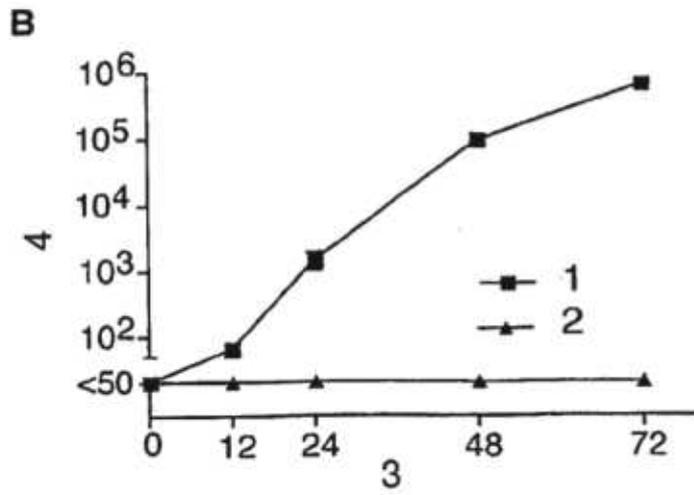
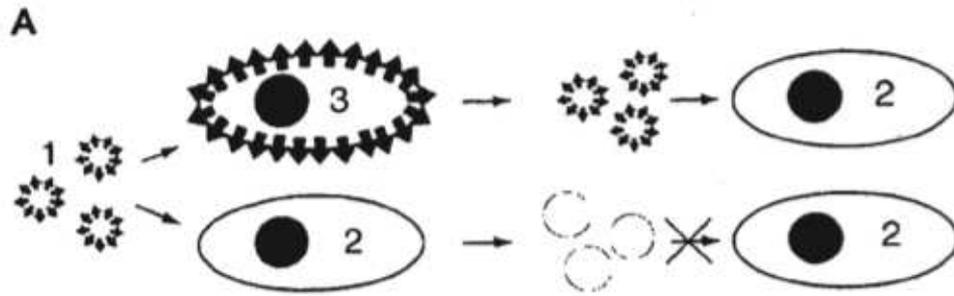
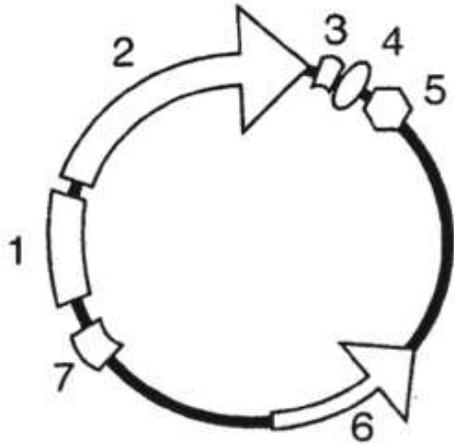
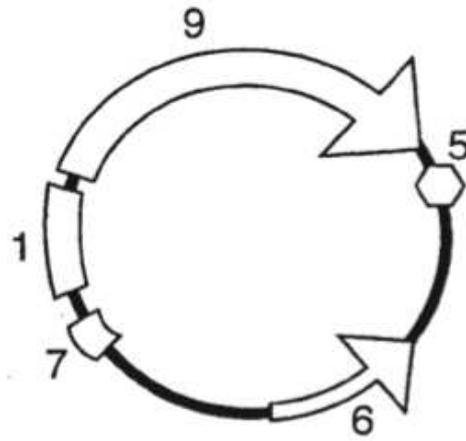
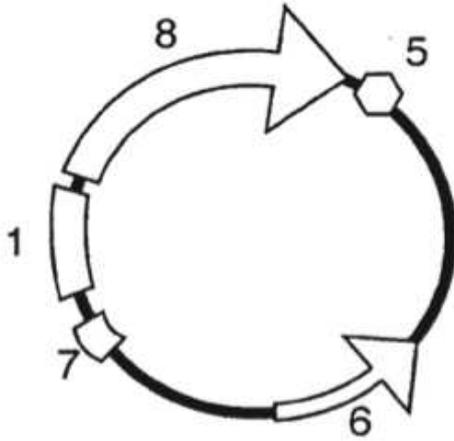


Fig. 2

A



B



C

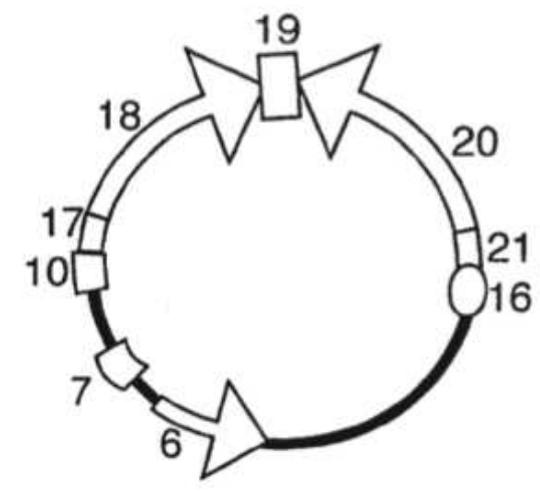
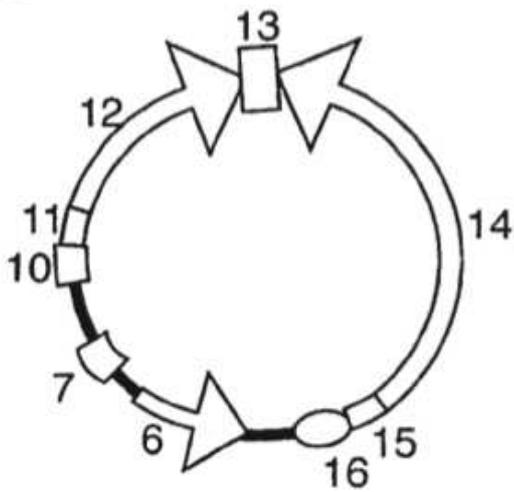




Fig. 4

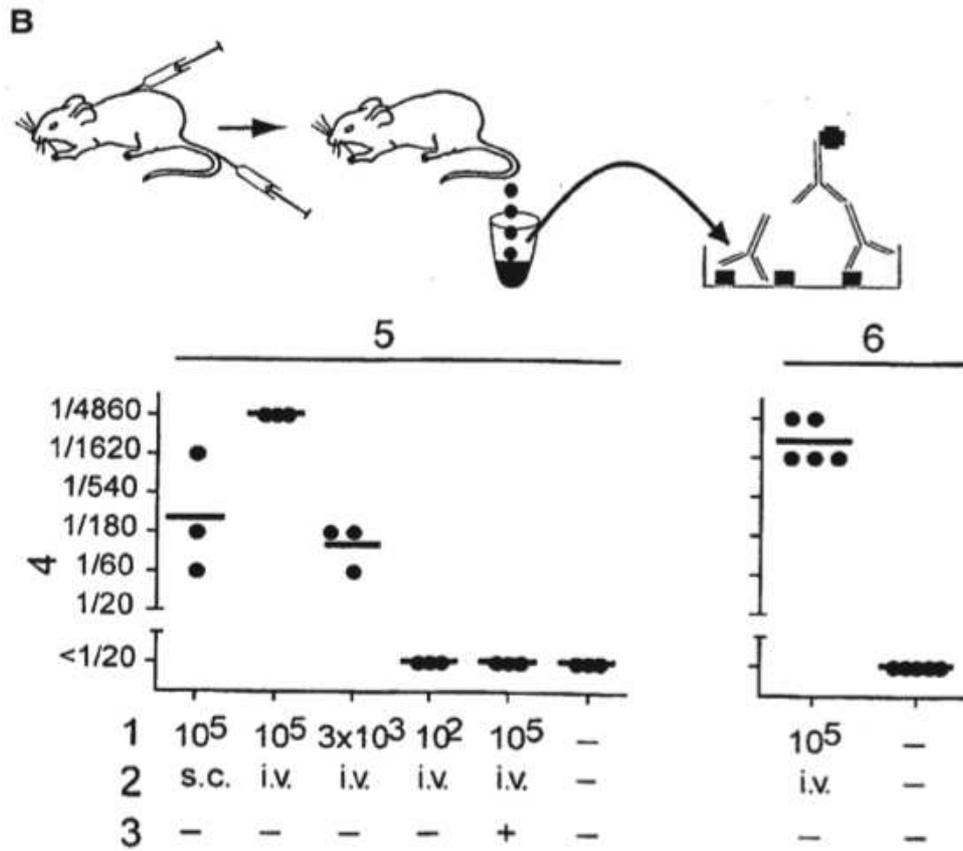
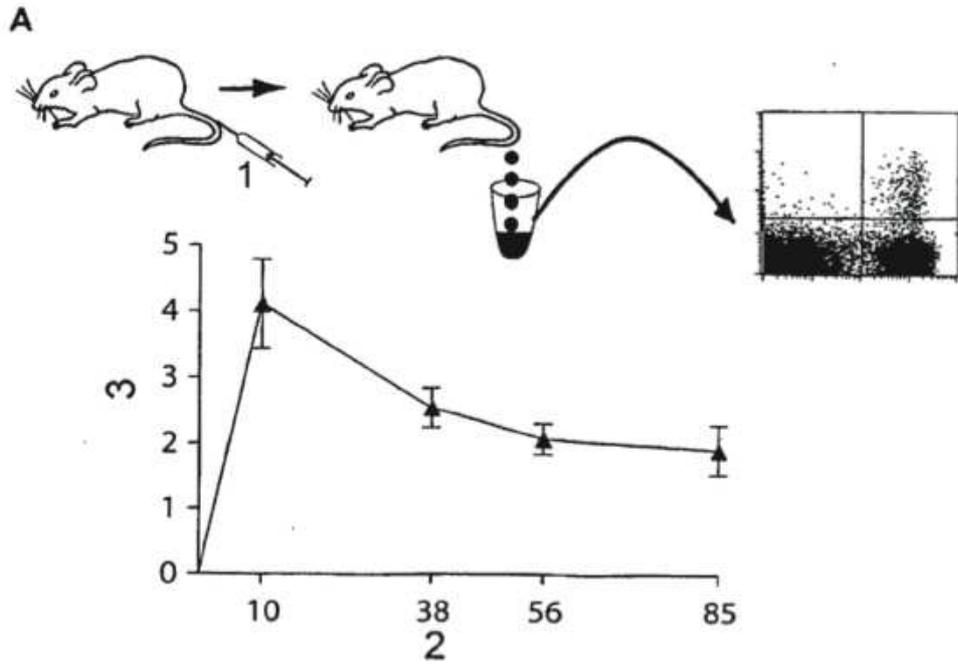


Fig. 5

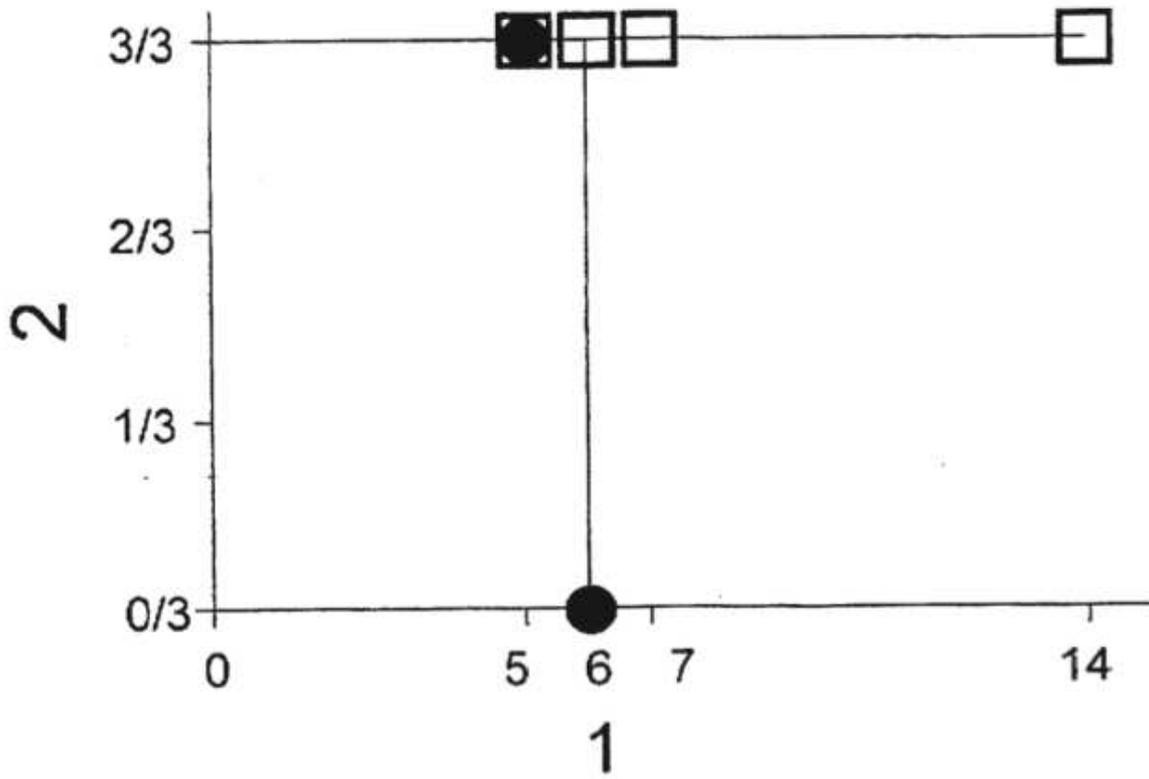
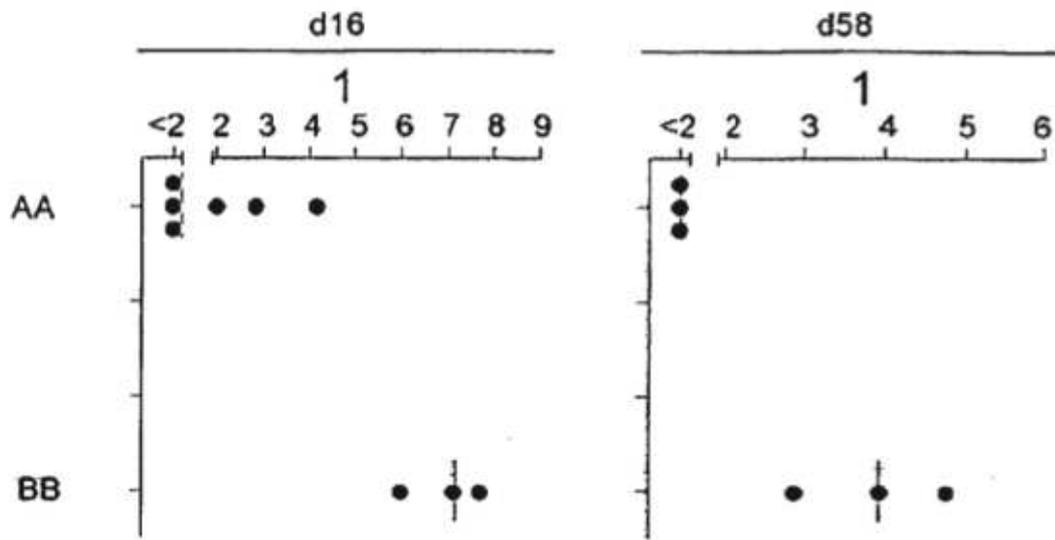


Fig. 6

A



B

