

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 724**

51 Int. Cl.:

A61K 39/295 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2002 E 02756112 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 1401859**

54 Título: **Vectores de flavivirus quiméricos**

30 Prioridad:

01.06.2001 US 295265 P

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

24.01.2014

73 Titular/es:

**SANOVI PASTEUR BIOLOGICS, LLC (100.0%)
1209 Orange Street
Wilmington, New Castle DE 19801, US**

72 Inventor/es:

**KLEANTHOS, HAROLD;
OROS, LARISA y
MILLER, CHARLES**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 439 724 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 de flavivirus quiméricos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a vectores de flavivirus quiméricos.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Los flavivirus son virus de ARN de hebra positiva pequeños con cubierta. Las proteínas de flavivirus son producidas por traducción de un único marco de lectura abierto largo para generar una poliproteína, lo que es seguido por una serie compleja de escisiones proteolíticas post-traduccionales de la poliproteína mediante una combinación de proteasas del hospedante y víricas para generar proteínas víricas maduras (Amberg *et al.*, J. Virol. 73:8083-8094, 1999; Rice, "Flaviviridae", en Virology, Fields (ed.), Raven-Lippincott, Nueva York, 1995, Volumen I, p. 937). Las proteínas estructurales víricas están dispuestas en la poliproteína en el orden C-prM-E, en el que "C" es la cápsida, "prM" es un precursor de la proteína M unida a la cubierta vírica, y "E" es la proteína de cubierta. Estas proteínas están presentes en la región N-terminal de la poliproteína, mientras que las proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, y NS5) están situadas en la región C-terminal de la poliproteína.

20 Se ha obtenido un flavivirus quimérico que incluye las proteínas C y no estructurales de la cepa (YF 17D) de la vacuna del virus de la fiebre amarilla y las proteínas prM y E de una cepa del virus de encefalitis japonesa atenuado (SA 14-14-2). Se ha demostrado que esta quimera, denominada ChimeriVax™-JE, induce la producción de anticuerpos neutralizantes contra JE en monos rhesus inmunizados, así como protege a estos monos de la encefalitis clínica tras la exposición a JE, en comparación con controles no inmunizados. Se demostró que ChimeriVax™-JE cumple los requisitos de seguridad preclínicos para una vacuna humana (Monath *et al.*, J. Virol. 74(4):1742-1751, 2000).

30 Se obtuvo una quimera similar que incluye las proteínas C y no estructurales de YF 17D y las proteínas prM y E de la cepa del Dengue-2. Se demostró que esta quimera, denominada ChimeriVax-D2, induce anticuerpos neutralizantes contra el virus del Dengue-2 en monos rhesus, así como protege a estos monos de la viremia tras la exposición al Dengue-2, en comparación con controles no inmunizados. También se demostró que ChimeriVax-D2 es segura y genéticamente estable (Guirakhoo *et al.*, J. Virol. 74(12):5477-5485, 2000).

35 **Sumario de la invención**

40 Se describen métodos para identificar sitios en las proteínas de cubierta de flavivirus quiméricos o flavivirus genéticamente atenuados que son permisivos para la inserción de péptidos extraños. Estos métodos incluyen las etapas de: (i) introducir una molécula de ácido nucleico que codifica un péptido extraño en un gen que codifica una proteína de cubierta de flavivirus; (ii) generar un vector de flavivirus que incluye una proteína de cubierta codificada por el gen, en el que la proteína de cubierta contiene el péptido extraño; y (iii) determinar si el vector de flavivirus generado en la etapa (ii) es permisivo para la inserción.

45 La invención proporciona un vector de flavivirus según la reivindicación 1.

Los péptidos extraños insertados en los vectores de la invención pueden incluir epítopos derivados de, por ejemplo, antígenos de patógenos víricos, bacterianos o parasitarios, o pueden incluir epítopos derivados de antígenos asociados a tumores. Más abajo se proporcionan ejemplos de estos y otros péptidos.

50 Las moléculas de ácido nucleico se introducen en el gen de cubierta del flavivirus del virus de la encefalitis japonesa SA14-14-2.

Los métodos descritos pueden incluir además comparar el análisis de los vectores de flavivirus con un análisis similar del flavivirus a partir del que se derivó.

55 Los péptidos extraños insertados en los vectores pueden incluir epítopos derivados de antígenos de patógenos víricos, bacterianos o parasitarios. Como alternativa, los péptidos extraños pueden incluir epítopos derivados de antígenos asociados a tumores.

60 También se incluyen en la invención composiciones farmacéuticas que incluyen los vectores de flavivirus descritos anteriormente y vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como métodos para suministrar péptidos a pacientes administrando a los pacientes tales composiciones. Estos métodos se pueden llevar a cabo, por ejemplo, cuando los péptidos son antígenos, para inducir una respuesta inmunitaria frente a patógenos o tumores a partir de los que derivan los antígenos. La invención también incluye el uso de estas composiciones para el suministro de péptidos, así como su uso en la preparación de medicamentos para el suministro de péptidos.

La invención también incluye moléculas de ácidos nucleicos que incluyen los genomas de los flavivirus descritos anteriormente o de sus complementos.

5 La invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, los vectores de flavivirus quiméricos que se pueden usar en la invención están suficientemente atenuados para ser seguros, y todavía son capaces de inducir inmunidad protectora a los flavivirus a partir de los que derivan las proteínas de cubierta en las quimeras y, en particular, los epítomos insertados en las quimeras. La seguridad adicional procede del hecho de que los vectores usados en la invención son quiméricos, eliminando así la posibilidad de inversión a tipo salvaje. Una ventaja adicional de los vectores usados en la invención es que los flavivirus se replican en el citoplasma de las células, de manera que la estrategia de replicación del virus no implica la integración del genoma vírico en la célula hospedante, proporcionando una medida de seguridad importante. Además, como se discute adicionalmente más abajo, se puede usar un único vector de la invención para suministrar múltiples epítomos a partir de un único antígeno, o epítomos derivados de más de un antígeno.

15 Otras características y ventajas de la invención serán manifiestas a partir de la siguiente descripción detallada, los dibujos, y las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 es una representación esquemática de un método de mutagénesis de transposones, llevado a cabo con el gen que codifica la cubierta de JE.

25 La figura 2 muestra los resultados del análisis mediante PCR de mutantes de inserción Tn5 del gen que codifica la cubierta de JE. Los clones estables que poseen un transposón en la cubierta de JE se muestran en las líneas 1, 2, 8 y 10; los clones que poseen un transposón en el vector pUC19 se muestran en las líneas 3 y 4; los clones inestables que poseen un transposón en la cubierta de JE se muestran en las líneas 5-7 y 9; y en la línea 11 se muestra un marcador de 1 kilobase.

30 La figura 3 muestra los resultados del cartografiado mediante PCR de plásmidos mutantes selectos. Este análisis confirmó la naturaleza aleatoria de la inserción en la cubierta de JE. Las líneas 1-13 muestran los productos de la PCR de 13 clones, mientras que la línea 14 contiene un marcador de 1 kilobase.

35 La figura 4 muestra las secuencias de aminoácidos de cinco clones mutantes que se seleccionaron para la transfección de células Vero. Las secuencias de la cubierta de JE están en negrita, y las secuencias del inserto tras la transposición están subrayadas. Las secuencias restantes, que son conjuntos repetidos de tres aminoácidos cada uno que están en el lado izquierdo del primer guión y en el lado izquierdo del segundo guión en cada línea, son artefactos de la mutagénesis de transposones.

40 La figura 5 es una representación esquemática de la glucoproteína de cubierta de JE, que muestra las localizaciones de insertos con respecto a epítomos conformacionales definidos de la proteína. Las flechas ubican los sitios de inserción aproximados para 5 mutantes de la cubierta de JE independientes que se seleccionaron para la transfección de células Vero. Los números entre corchetes indican el aminoácido de la cubierta de JE que precede al inserto de 19 aminoácidos.

45 La figura 6 muestra los resultados del análisis mediante RT-PCR de ADNc sintetizado a partir de ARN extraído de células Vero que se han transfectado con ARN obtenido de 5 clones únicos (2 por duplicado). Se amplificó un inserto de 1,9 kilobases que incluye el ligador de 57 pares de bases a partir de cada uno de los clones, y se confirmó la producción de virus de progenie. En la línea 1 se fraccionó un marcador de 1 kilobase. Las líneas 2-8 corresponden al clon O-10-2, clon I-10-3, clon II-4-3, clon II-4-6, clon I-1, clon III-6, y clon IV-8-1, respectivamente.

50 La figura 7 muestra los resultados del análisis mediante PCR del ADNc del clon I-10 a P2 hasta P6 (líneas 2-6 y 8-12, respectivamente). Las muestras fraccionadas en el panel izquierdo se obtuvieron usando cebadores específicos de la cubierta de JE, mientras que las muestras fraccionadas en el panel derecho se obtuvieron usando un cebador específico de transposones. En la línea 1 se fraccionó un marcador de 1 kilobase, y en la línea 7 se fraccionó un marcador de 100 pares de bases.

60 La figura 8 muestra las secuencias nucleotídicas de los productos de la RT-PCR del clon infeccioso I-10 a P2 hasta P6, alineadas con la secuencia del plásmido I-10 antes de la transfección. Las flechas indican dos restos de cisteína en el inserto que tienen el potencial de formar un enlace de disulfuro, estabilizando posiblemente el péptido en la proteína de cubierta y presentándolo en la superficie de la cubierta.

65 La figura 9 es una representación esquemática de la estructura tridimensional de la glucoproteína de cubierta de JE, que muestra que el sitio permisivo en la posición de aminoácidos 287 está situado entre los dominios central (I) y de dimerización (II), y parece que está expuesta en la superficie.

La figura 10 es una gráfica que muestra las propiedades de crecimiento del clon infeccioso I-10. La línea con los triángulos corresponde al título del mutante transposónico I-10, mientras que la línea con los cuadrados corresponden al título del virus progenitor YF/JE.

5 La figura 11 es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de neutralización del mutante transposónico I-10. La línea con el diamante corresponde al título de muestras incubadas con suero anti-JE, los cuadrados corresponden a muestras incubadas con suero normal, y la línea con guiones muestra el promedio.

10 La figura 12 es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de neutralización de la referencia YF/JE. La línea con el diamante corresponde al título de muestras incubadas con suero anti-JE, los cuadrados corresponden a muestras incubadas con suero normal, y la línea con guiones muestra el promedio.

Descripción detallada

15 Se describen métodos para identificar sitios en las proteínas de cubierta de flavivirus quiméricos o flavivirus genéticamente atenuados (por ejemplo, YF 17D), en los que se pueden introducir péptidos extraños. La invención proporciona vectores de flavivirus quiméricos que tienen proteínas de cubierta que incluyen péptidos extraños, y métodos para suministrar estos péptidos mediante administración de los vectores a fin de, por ejemplo, inducir una respuesta inmunitaria frente a un patógeno a partir del que deriva el péptido introducido. Más abajo se proporcionan
20 detalles de estos vectores, péptidos y métodos.

Vectores de flavivirus quiméricos

25 Los virus quiméricos que se pueden usar en la invención consisten en un Virus de la Fiebre Amarilla 170 (es decir, un flavivirus estructural) en el que las proteínas prM y E se han sustituido por las proteínas prM y E del virus de la encefalitis japonesa SA-14-14-2.

30 El virus quimérico que se puede usar en la invención es la cepa de la vacuna humana de la fiebre amarilla, YF 17D en la que las proteínas prM y E se han sustituido por las proteínas prM y E otro flavivirus, tal como el virus de la encefalitis japonesa SA-14-14-2.

35 El siguiente flavivirus quimérico, que se depositó en la American Type Culture Collection (ATCC) en Manassas, Virginia, U.S.A. bajo los términos del Tratado de Budapest y concedió una fecha de depósito de 6 de enero de 1998, se puede usar en la invención: Virus Quimérico de la Fiebre Amarilla 17D/Encefalitis Japonesa SA14-14-2 (YF/JE A1.3; número de acceso ATCC VR-2594).

Métodos para identificar sitios permisivos en proteínas de cubierta de flavivirus quiméricos

40 Los sitios en las proteínas de cubierta de flavivirus quiméricos que son permisivos a la inserción de secuencias extrañas se pueden identificar según lo siguiente. Se insertan secuencias de ácidos nucleicos que codifican un péptido en el gen de cubierta usando métodos estándar de biología molecular. Preferiblemente, tales secuencias de ácidos nucleicos se insertan aleatoriamente en el gen de cubierta, para facilitar la creación de una librería de mutantes de inserción. Sin embargo, como alternativa, una secuencia de ácido nucleico se puede insertar en un punto específico en un gen de cubierta, y se puede evaluar en busca de la eficacia. Este último enfoque puede ser
45 deseable, por ejemplo, cuando se ha identificado un sitio particular como permisivo para la inserción de una primera secuencia extraña y se desea confirmar que también es permisivo para la inserción de una segunda secuencia que puede, por ejemplo, diferir en longitud o estructura secundaria predicha de la primera secuencia extraña.

50 La inserción al azar de secuencias de ácidos nucleicos se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso de un enfoque de mutagénesis de transposones. Por ejemplo, se puede usar un sistema de transposición Tn5 (Goryshin *et al.*, J. Biol. Chem. 273:7367, 1998): Como ejemplo específico, se puede usar el sistema de inserción EZ::TN, que está fabricado por Epicentre Technologies (Madison, WI, U.S.A.).

55 En resumen, un gen de cubierta de flavivirus clonado se somete a mutagénesis con transposones que incluyen secuencias que codifican péptidos. Se genera una librería de mutantes que incluye transposones integrados aleatoriamente en genes de cubierta de flavivirus, y, si se desea, los sitios de inserción se cartografían y/o se secuencian. Entonces se genera ARN genómico de longitud completa que incluye genes de cubierta mutantes, y se usa para obtener virus mutantes, que entonces se caracterizan en busca de la permisividad a la inserción de los transposones. Los virus se pueden analizar en busca de la permisividad, por ejemplo, mediante determinación de la infecciosidad, estabilidad genómica, propiedades de crecimiento, y neutralización. Más abajo, en el contexto del flavivirus quimérico ChimeriVax™-JE (véase también la figura 1), se proporcionan detalles del uso de este sistema de mutagénesis de transposones.

Péptidos extraños

65 Los vectores de la invención se pueden usar en el suministro de cualquier péptido o proteína de valor profiláctico o

terapéutico. Por ejemplo, los vectores de la invención se pueden usar en la inducción de una respuesta inmunitaria (profiláctica o terapéutica) frente a cualquier antígeno a base de proteínas que se inserta en una proteína de cubierta de flavivirus quiméricos. Por ejemplo, tal antígeno no deriva del segundo flavivirus de la quimera. Todo lo que se requiere es que una secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno se inserte en un sitio permisivo dentro del gen de cubierta de un flavivirus quimérico, como se describe aquí. Se pueden usar métodos estándar de biología molecular para insertar las moléculas de ácido nucleico que codifican antígenos en los genes de cubierta quiméricos, en sitios permisivos, que se describen aquí.

Los vectores de la invención pueden incluir cada uno un único epítipo. Como alternativa, en los vectores se pueden insertar múltiples epítipos, ya sea en un único sitio (es decir, como un politopo, en el que los diferentes epítipos pueden estar separados por un ligador flexible, tal como un tramo de aminoácidos de poliglicina), en sitios diferentes, o en cualquier combinación de los mismos. Los epítipos diferentes pueden derivar de una única especie de patógeno, o pueden derivar de diferentes especies y/o diferentes géneros.

Los antígenos que se pueden usar en la invención pueden derivar, por ejemplo, de agentes infecciosos tales como virus, bacterias y parásitos. Por ejemplo, se pueden usar antígenos de los patógenos enumerados en la Tabla 2, más abajo. Los ejemplos específicos de tales antígenos incluyen aquellos enumerados en la Tabla 3. Además, en la Tabla 4 se proporcionan ejemplos específicos de epítipos que se pueden insertar en los vectores de la invención. Como se observa en la Tabla 4, los epítipos que se usan en los vectores de la invención pueden ser epítipos de células B (es decir, epítipos neutralizantes) o epítipos de células T (es decir, epítipos específicos de células auxiliares T y células citotóxicas T).

Los vectores de la invención se pueden usar para suministrar antígenos, además de antígenos derivados de patógenos. Por ejemplo, los vectores de la invención se pueden usar para suministrar antígenos asociados a tumores, para uso en métodos inmunoterapéuticos contra el cáncer. En la técnica se conocen numerosos antígenos asociados a tumores, y se pueden usar en la invención. Los ejemplos de cánceres (y antígenos asociados a tumores correspondientes) son los siguientes: melanoma (proteína NY-ESO-1 (específicamente epítipo CTL situado en las posiciones de aminoácidos 157-165), CAMEL, MART 1, gp100, proteínas relacionadas con tirosina TRP1 y 2, y MUC1)); adenocarcinoma (proteína ErbB2); cáncer colorrectal (17-1A, 791Tgp72, y antígeno carcinoembrionario); cáncer de próstata (PSA1 y PSA3). Como tal antígeno, también se puede usar la proteína de choque térmico (hsp110).

En otra realización de la invención, se pueden usar proteínas exógenas que codifican un epítipo o epítipos de un antígeno inductor de alergia frente al cual se desea una respuesta inmunitaria. Además, los vectores de la invención pueden incluir ligandos que se usan para seleccionar como dianas los vectores para suministrar péptidos, tales como antígenos, hacia células particulares (por ejemplo, células que incluyen receptores para los ligandos) en sujetos a los que se administran los vectores.

El tamaño del péptido o proteína que se inserta en los vectores de la invención puede oscilar en longitud desde 20 a 55 aminoácidos. La idoneidad de usar cualquier péptido particular deseado se puede determinar fácilmente usando los métodos descritos aquí.

Uso de vectores de flavivirus quiméricos para suministrar péptidos extraños

Los vectores de la invención se administran en cantidades y usando métodos que se pueden determinar fácilmente por persona de pericia normal en esta técnica. Los vectores se pueden administrar y formular, por ejemplo, de la misma manera que la vacuna de la fiebre amarilla 17D, por ejemplo como una suspensión aclarada de tejido de embrión de pollo infectado, o un fluido recogido de cultivos celulares infectados con el virus de la fiebre amarilla quimérico. De este modo, los vectores de la invención se pueden formular como disoluciones acuosas estériles que contienen entre 100 y 1.000.000 unidades infecciosas (por ejemplo, unidades formadoras de placas o dosis infecciosas de cultivo tisular) en un volumen de dosis de 0,1 a 1,0 ml, para ser administrados, por ejemplo, mediante las vías intramuscular, subcutánea o intradérmica. Además, debido a que los flavivirus pueden ser capaces de infectar al hospedante humano *vía* las vías mucosales, tal como la vía oral (Gresikova *et al.*, "Tick-borne Encephalitis", en *The Arboviruses, Ecology and Epidemiology*, Monath (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 1988, Volumen IV, 177-203), los vectores se pueden administrar mediante una vía mucosal.

Cuando se usan en métodos de inmunización, los vectores se pueden administrar como un agente profiláctico primario en adultos o niños con riesgo de infección por un patógeno particular. Los vectores también se pueden usar como agentes secundarios para tratar pacientes infectados estimulando una respuesta inmunitaria contra el patógeno del que deriva el antígeno peptídico.

Para aplicaciones de vacuna, se pueden usar adyuvantes que son conocidos por los expertos en la técnica. Los adyuvantes que se pueden usar para potenciar la inmunogenicidad de los vectores quiméricos incluyen, por ejemplo, formulaciones liposómicas, adyuvantes sintéticos, tales como (por ejemplo, QS21), dipéptido muramílico, monofosforil lípido A, o polifosfazina. Aunque estos adyuvantes se usan típicamente para potenciar respuestas inmunitarias a vacunas inactivadas, también se pueden usar con vacunas vivas. En el caso de un vector quimérico

suministrado vía mucosal, por ejemplo oralmente, se pueden usar como adyuvantes los adyuvantes mucosales tales como la toxina de *E. coli* lábil al calor (LT) o derivaciones mutantes de LT. Además, en los vectores se pueden insertar genes que codifican citocinas que tienen actividades adyuvantes. De este modo, se pueden insertar genes que codifican citocinas, tales como GM-CSF, IL-2, IL-12, IL-13, o IL-5, junto con genes de antígenos extraños para producir una vacuna que da como resultado respuestas inmunitarias potenciadas, o para modular la inmunidad dirigida más específicamente hacia respuestas celulares, humorales o mucosales.

Además de las aplicaciones de vacuna, como puede entender fácilmente un experto en la técnica, los vectores de la invención se pueden usar en métodos de terapia génica para introducir productos génicos terapéuticos en células de pacientes, y en terapia contra el cáncer. En estos métodos, los genes que codifican productos génicos terapéuticos se insertan en sitios permisivos en los vectores.

Ejemplo

El siguiente ejemplo experimental muestra la identificación de sitios permisivos en ChimeriVax™-JE. Los métodos descritos en este ejemplo se pueden usar igualmente con otros flavivirus quiméricos, tales como los descritos anteriormente.

La cepa de la vacuna atenuada viva de la fiebre amarilla 17D (YF 17D) se ha usado en seres humanos durante los últimos 60 años, tiene un excelente registro de seguridad, y proporciona inmunidad duradera tras la administración de una única dosis. Como se señala anteriormente, ChimeriVax™-JE es una cepa de vacuna recombinante atenuada viva en la que los genes que codifican las proteínas estructurales (PrME) de YF 17D se han sustituido por los genes correspondientes del virus de la encefalitis japonesa (JE) genéticamente atenuado SA14-14-2. Tanto los genes de la cápsida como todos los genes no estructurales (NS) responsables de la replicación intracelular de esta quimera derivan de la cepa de la vacuna de YF 17D. Como se señala anteriormente, se ha descrito previamente un clon molecular infeccioso de ChimeriVax™-JE (YF/JE). En los experimentos descritos más abajo, se evaluó ChimeriVax™-JE en cuanto a su idoneidad como un vehículo de suministro para péptidos biológicamente relevantes.

El EZ::TN In-Frame Linker Insertion Kit® (Epicentre) es un método rápido y eficiente para insertar aleatoriamente péptidos de 19 aminoácidos en el marco en proteínas codificadas por ADN clonado para una variedad de aplicaciones. Usando este enfoque, se escogió identificar sitios en el gen de cubierta de ChimeriVax™-JE que son permisivos para ADN extraño. Como se explica con más detalle más abajo, la mutagénesis al azar en *E. coli* del gen que codifica la proteína de cubierta de JE con EZ::TN identificó un banco de mutantes de inserción estables que portan el fragmento de 57 pares de bases que codifica el péptido de 19 aminoácidos. El análisis de la secuencia del ADN, el cartografiado de restricción, y los estudios de PCR confirmaron tanto la localización exacta del transposón como la naturaleza aleatoria de la inserción. La manipulación mediante ingeniería del gen de cubierta de JE mutado nuevamente en el clon infeccioso ChimeriVax™-JE nos permitió estudiar la infección en cultivo celular y proporcionó información valiosa sobre el uso de flavivirus recombinantes como vehículos de suministro para antígenos extraños. Se identificó un panel de clones mutantes infecciosos para células Vero, y se caracterizaron sus propiedades biológicas. Específicamente, se comparó las propiedades de crecimiento de clones infecciosos estables con la quimera progenitora ChimeriVax™-JE en cultivo celular, así como su capacidad para ser neutralizados en un ensayo de neutralización por reducción de placas (PRNT) con antisueros policlonales específicos para JE. Se identificaron sitios en la cubierta de JE que son permisivos para la inserción de ADN extraño, y estos sitios se pueden explotar para el suministro de epítomos biológicamente relevantes. Otros detalles se proporcionan en lo siguiente.

Clonación del gen que codifica la cubierta de JE en pUC19

Se extrajo ARN vírico de YF/JE a partir de células Vero infectadas usando el reactivo Trizol (Gibco BRL). Tras la síntesis de ADNc con el cebador antisentido FNOR (véase más abajo), el gen que codifica la cubierta de JE SA14-14-2 se amplificó mediante XL-PCR con los cebadores TN1.F/TN2.R (véase más abajo), y se clonó direccionalmente mediante métodos convencionales en pUC19 (New England Biologicals, NEB, U.S.A.) usando secuencias de reconocimiento KpnI y PstI incorporadas en los extremos 5' de cada oligonucleótido, generando pJEe1. La PCR se llevó a cabo usando un GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

Mutagénesis de transposones y cartografiado de los sitios de inserción

La mutagénesis de inserción se llevó a cabo en pJEe1 usando el EZ::TN™ In-Frame Linker Insertion Kit (EPICENTRE Technologies, U.S.A.), según las instrucciones del fabricante. El transposón EZ::TN <NotI/Kan-3> contiene un gen de resistencia a canamicina flanqueado por sitios de restricción Not I. Como se discute adicionalmente más abajo, la eliminación del gen de resistencia a canamicina tras la digestión con NotI y la religación generan una inserción de 19 codones que se puede leer en los tres marcos de lectura.

Se identificaron mutantes de inserción en *E. coli* mediante selección en agar LB más canamicina (50 µg/ml). La PCR con TN1.F/TN2.R en los clones seleccionados resistentes a canamicina tras la transposición reveló que el 40% de los clones mantuvo de forma estable el transposón en la cubierta de JE (figura 2). Los sitios de inserción se

cartografiaron mediante PCR (Pwo DNA Polymerase, Boehringer Mannheim/Roche) usando cebadores TN1.F y NotI/KAN-3 RP-2 específicos de Tn5, que mostró que el transposón Tn5 se insertó aleatoriamente en la cubierta de JE (figura 3). Se seleccionaron clones únicos para la secuenciación y generación de ARN genómico mutante de longitud completa.

5

Secuenciación

Las secuencias de aminoácidos de cinco clones mutantes que se seleccionaron para la transfección de células Vero se muestran en la figura 4. Las localizaciones de los insertos con respecto a epítomos de conformación definidos en la proteína de cubierta del virus JE se muestran en la figura 5. Los sitios de inserción se determinaron mediante secuenciación de ADN, y los insertos se localizaron mediante comparación con una estructura tridimensional predicha de la cubierta de JE (Kolaskar *et al.*, Virology 261:31-42, 1999). Cuatro de los cinco sitios de inserción parecen estar expuestos en la superficie. La secuenciación se llevó a cabo usando un CEQ™ 2000 DNA Analysis system (Beckman Coulter) y un CEQ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit. Los datos se analizaron usando SEQUENCHER™, Versión 4.0.5. (Gene Codes Corporation).

10

15

Construyendo clones infecciosos que poseen inserciones Tn5

El gen de resistencia a antibióticos se eliminó de clones de *E. coli* estables, que entonces se volvieron a ligar, dejando una inserción en el marco de 57 pares de bases que incluyó un duplicado de secuencia de sitio diana de 9 pares de bases que flanquea el transposón. Los clones de muestra (n = 5) que contienen la cubierta de JE religada se digirieron entonces con NheI/NarI (NEB, U.S.A.), para que sean compatibles para la clonación en un sistema de dos plásmidos descrito previamente para generar genomas de YF/JE de longitud completa (Chambers *et al.*, 1999, más arriba).

20

25

Transcripción y transfección

La transcripción de ADN genómico linealizado de longitud completa, que posee ADN extraño, en el gen que codifica la cubierta de JE se llevó a cabo a partir del promotor SP6 usando el AmpliScribe™ SP6 High Yield Transcription Kit (EPICENTRE Technologies). Placas de seis pocillos, sembradas con células Vero, se transfectaron con ARN genómico transcrito *in vitro* en presencia de reactivo LIPOFECTIN (Life Technologies), y se mantuvieron en MEM (Life Technologies) suplementado con 5% de FBS (Hyclone), NEAA (Life Technologies), y 1% de penicilina-estreptomicina (Sigma Chemicals). Los sobrenadantes celulares (500 ml) se hicieron pasar a células recientes cada 6 días a través de P6, y la monocapa se monitorizó en busca de efectos citopáticos (CPE). El ARN vírico se extrajo de la monocapa celular y sobrenadante en cada pasada.

30

35

Como se muestra en la figura 6, todos los clones mutantes fueron infecciosos para células Vero a P2. En particular, RT-PCR que usa TN1.F/TN2.R en ADNc sintetizado a partir de extractos de ARN de monocapas celulares amplificó un inserto de 1,9 kilobases que posee el ligador de 57 pares de bases, y confirma la producción de virus de progenie. El análisis mediante PCR del clon I-10 desde P2 hasta P6 muestra que este clon es estable durante P6, y que su sitio de inserción, en el aminoácido 287, es permisivo para la inserción de ADN extraño. La PCR se llevó a cabo con cebadores específicos para el gen de cubierta de JE (TN1.F/TN2.R) y un cebador específico de transposón (TN1.F/TMOS.R) (figura 7).

40

45

50

Se determinó la secuencia de ADN de los productos de la RT PCR desde P2 hasta P6, y, como se muestra en la figura 8, las secuencias en cada pasada fueron idénticas a la secuencia del clon original, I-10. De forma interesante, el inserto del transposón I-10 contiene dos restos de cisteína que tienen el potencial para formar un enlace de disulfuro, que posiblemente estabiliza el péptido extraño en la proteína de cubierta y lo presenta en la superficie de la molécula. La figura 9 representa una estructura tridimensional de la glucoproteína de cubierta del virus JE, y muestra que la posición 287 está situada entre el dominio central (I) y el dominio de dimerización (II), y parece estar expuesta en la superficie.

50

Las propiedades biológicas del mutante transposónico I-10 se determinaron y compararon con las de ChimeriVax™-JE. En primer lugar, se determinaron las propiedades de crecimiento del clon I-10. Como se muestra en la figura 10, el clon infeccioso mutante I-10 muestra cinética de crecimiento similar al progenitor ChimeriVax™-JE, pero crece a un título ligeramente inferior, alcanzando 8e5 PFU/ml, en comparación con 1e7 PFU/ml para YF/JE. También, se encontró que el clon infeccioso mutante I-10 induce un efecto citopático en células Vero, análogo a su progenitor YF/JE.

55

60

65

Entonces se llevaron a cabo ensayos de neutralización por reducción de placas (PRNT). Se mostró que una preparación de antiseros policlonales anti-JE neutraliza el clon I-10 y ChimeriVax™-JE en el mismo grado (1:64.000), confirmando la idoneidad de insertar ADN extraño en la cubierta de la quimera de JE sin afectar excesivamente la integridad estructural de la cubierta vírica (Figuras 11 y 12). Estos experimentos muestran que la posición de aminoácido 287 de la cubierta de JE en ChimeriVax™-JE es permisiva para la inserción de ADN extraño. También se proporcionan pruebas de que las posiciones de aminoácidos 59, 231, 340 y 436 son permisivas para la inserción de secuencias extrañas.

Tabla 1 – cebadores de PCR

5 Para la clonación en pUC19:
 TN1.F 5'-GCCGGTACCCACGATATCTCATGAAACTG-3'
 TN2.R 5'-CTGCAGACCATCCCGAATTCTGGAAAATGG-3'

10 Para estudios de cartografiado:
 Not //KAN-3 FP-2 5'-ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC-3'
 Not //KAN-3 RP-2 5'-TCCCGTTGAATATGGCTCATAAC-3'
 TMOS.F 5'-CTGTCTCTTGTACACATCTTGCGGCCGC-3'

15 Para la síntesis de ADNc usando SUPERSCRIPT™ II RNase H Reverse Transcriptase (Life Technologies):
 FNOR 5'-CCTGGGGAGAACACAAGGTTTC-3'
 YF 2.6- 5'-AAGAGGCTTTCACCTATTGATG-3'

20

Tabla 2 – Lista de ejemplos de patógenos a partir de los que se pueden derivar antígenos/péptidos

VIRUS:

Flaviviridae

Virus de la fiebre amarilla
 Virus de la encefalitis japonesa
 Virus del dengue, tipos 1, 2, 3 y 4
 Virus del Nilo Oeste
 Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas
 Virus de la hepatitis C (por ejemplo, genotipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a, 4a, 4b, 4c, Y 4d)

Papoviridae:

Virus del papiloma

Retroviridae

Virus de la inmunodeficiencia humana, tipo I
 Virus de la inmunodeficiencia humana, tipo II
 Virus de la inmunodeficiencia del simio
 Virus linfotrópico T humano, tipos I y II

Hepnaviridae

Virus de la hepatitis B

Picornaviridae

Virus de la hepatitis A
 Rinovirus
 Poliovirus

Herpesviridae:

Virus del herpes simple, tipo I
 Virus del herpes simple, tipo II
 Citomegalovirus
 Virus de Epstein Barr
 Virus de varicela-Zóster

Togaviridae

Alfavirus
 Virus de la rubéola

Paramyxoviridae:

Virus sincitial respiratorio
 Virus de parainfluenza
 Virus del sarampión
 Virus de las paperas

Orthomyxoviridae

Virus de la influenza

Filoviridae

Virus de Marburgo
 Virus del ébola

Rotoviridae:

Rotavirus

Coronaviridae

Coronavirus

Adenoviridae
Adenovirus
Rhabdoviridae
Virus de la rabia

BACTERIAS:

E. coli enterotoxigénica
E. coli enteropatógena
Campylobacter jejuni
Helicobacter pylori
Salmonella typhi
Vibrio cholerae
Clostridium difficile
Clostridium tetani
Streptococcus pyogenes
Bordetella pertussis
Neisseria meningitidis
Virus de la rabia
Neisseria gonorrhoea
Legionella pneumophila
Clamydial spp.
Haemophilus spp.
Shigella spp.

PARÁSITOS:

Plasmodium spp.
Schistosoma spp.
Trypanosoma spp.
Toxoplasma spp.
Cryptosporidia spp.
Pneumocystis spp.
Leishmania spp.

Tabla 3 – Ejemplos de antígenos selectos de los virus enumerados

<u>VIRUS</u>	<u>ANTÍGENO</u>
Flaviviridae	
Virus de la fiebre amarilla	Glucoproteína de la nucleocápsida, M y E
Virus de la encefalitis japonesa	"
Virus del dengue, tipos 1, 2, 3 y 4	"
Virus del Nilo Oeste	"
Virus de la encefalitis transmitida por garrapatas	"
Virus de la hepatitis C	Glucoproteína de la nucleocápsida, E1 y E2
Papoviridae:	
Virus del papiloma	Proteína de la cápsida L1 y L2, proteína transformante E6 y E7 (oncogenes)
Retroviridae	
Virus de la inmunodeficiencia humana, tipo I	gag, pol, vif, tat, vpu, env, nef
Virus de la inmunodeficiencia humana, tipo II	"
Virus de la inmunodeficiencia del simio	"
Virus linfotrópico T humano, tipos I y II	gag, pol, env

5 Tabla 3 - Ejemplos de epítomos de células B y T de los virus/antígenos enumerados

<u>VIRUS</u>	<u>ANTÍGENO</u>	<u>EPÍTOPO</u>	<u>LOCALIZACIÓN</u>	<u>SECUENCIA (5'-3')</u>
<u>Flaviviridae</u>				
Hepatitis C	Nucleocápsida	CTL	2-9	STNPKPQR
			35-44	YLLPRRGPR
			41-49	GPRLGVRAT

ES 2 439 724 T3

		81-100	YPWPLYGNEGCGWAGWLLSP
		129-144	GFADLMGYIPLVGAPL
		132-140	DLMGYIPLV
		178-187	LLALLSCLTV
glucoproteína E1	CTL	231-250	REGNASRCWVAVTPTVATRD
glucoproteína E2	CTL	686-694	STGLIHLHQ
		725-734	LLADARVCSC
		489-496	CWHYPPRPCGI
		569-578	CVIGGVGNNT
		460-469	RRLTDFAQGW
		621-628	TINYTIFK
	célula B	384-410	ETHVTGGNAGRRTTAGLVGLLTPGAKQN
		411-437	IQLINTNGSWHNSTALNCNESLNTGW
		441-460	LFYQHKFNSSGCPERLASCR
		511-546	PSPVVVGTDRSGAPTYSWGANDTDVFLNTRPPL
	T auxiliar	411-416	IQLINT
<u>Papoviridae</u>			
HPV 16	E7	T auxiliar 48-54	DRAHYNI
		CTL 49-57	RAHYNIVTF
		célula B 10-14	EYMLD
		38-41	IDGP
		44-48	QAEPD
HPV 18	E7	T auxiliar 44-55	VNHQHLPARRA
		81-90	DDLRAFQQLF

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vector de flavivirus, que comprende una proteína de cubierta que comprende un péptido extraño insertado en la proteína de cubierta, en el que dicho péptido extraño tiene una longitud de 20-55 aminoácidos, en el que dicho vector es un flavivirus quimérico que comprende las proteínas de la cápsida y no estructurales de un virus de fiebre amarilla 17D y las proteínas de premembrana y de cubierta de un virus de encefalitis japonesa SA14-14-2, y el péptido extraño está insertado en una posición de aminoácidos seleccionada de entre 59, 231, 287, 340 o 436 de la proteína de cubierta del virus de la encefalitis japonesa SA14-14-2.
- 10 2. Vector de flavivirus según la reivindicación 1, en el que dicho péptido extraño comprende un epítipo derivado de un antígeno de un patógeno vírico, bacteriano o parasitario, o un epítipo derivado de un antígeno asociado a tumor.
- 15 3. Vector de flavivirus según la reivindicación 2, en el que dicho patógeno vírico se selecciona de entre el grupo que consiste en virus de la hepatitis C, virus del papiloma, virus de la inmunodeficiencia humana, tipo I, virus de la inmunodeficiencia humana, tipo II, virus de la hepatitis B, virus del herpes simple, tipo I, virus del herpes simple, tipo II, y virus de la gripe.
- 20 4. Vector de flavivirus según la reivindicación 2, en el que dicho patógeno bacteriano es *Clostridium difficile*.
5. Vector de flavivirus según la reivindicación 2, en el que dicho antígeno es la proteína de cápsida L2 del virus del papiloma.
- 25 6. Composición farmacéutica, que comprende el vector de flavivirus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
7. Composición farmacéutica de la reivindicación 6, para su utilización en el suministro de un péptido a un paciente.
- 30 8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, en la que el péptido es un antígeno, y dicha composición es para la administración para inducir una respuesta inmunitaria frente a un patógeno o tumor del que deriva dicho antígeno.
9. Molécula de ácido nucleico que comprende el genoma del flavivirus según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o su complemento.

Fig. 1

Mutagénesis de transposones en gen que codifica la cubierta de JE

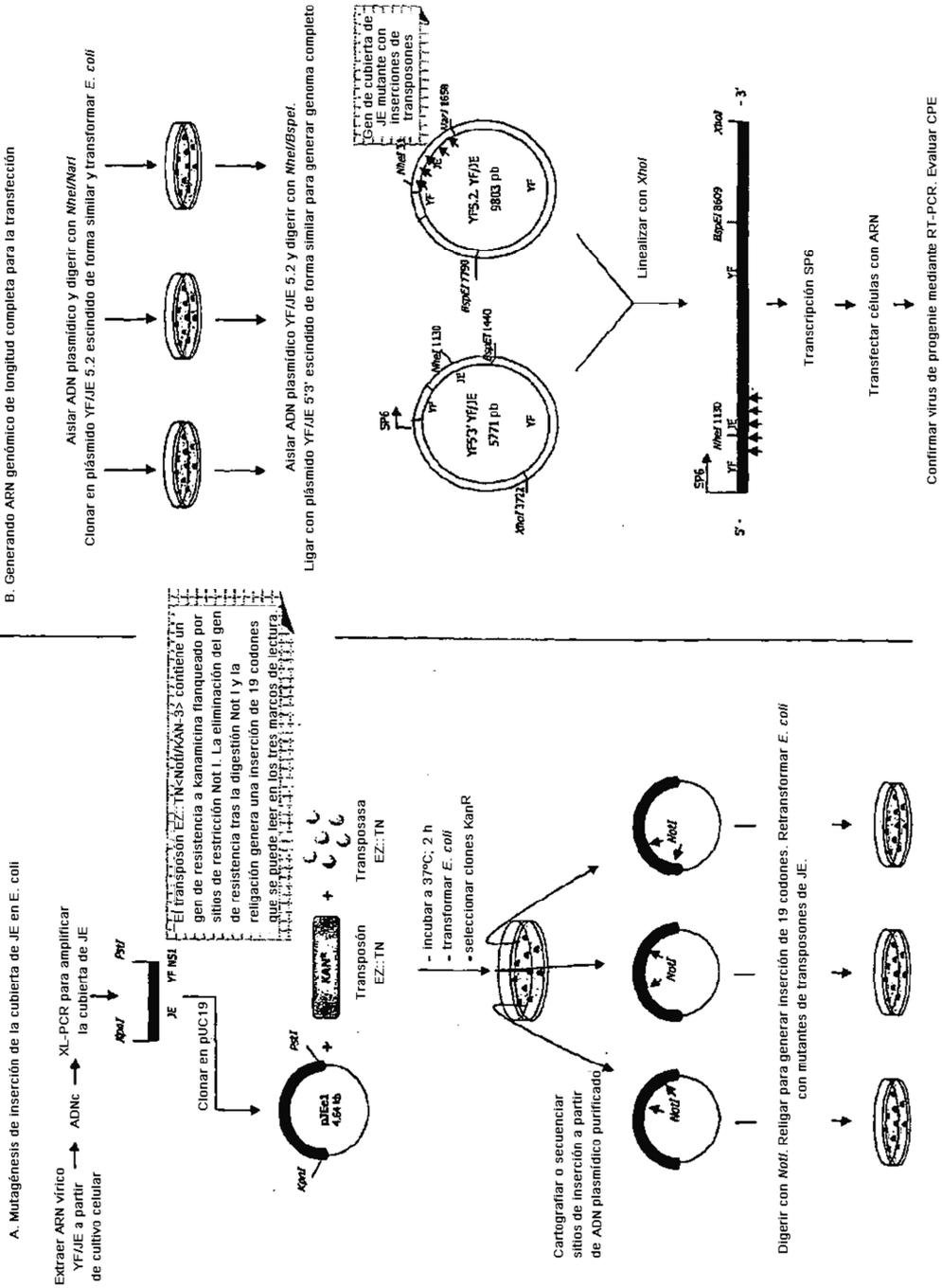


Fig. 2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

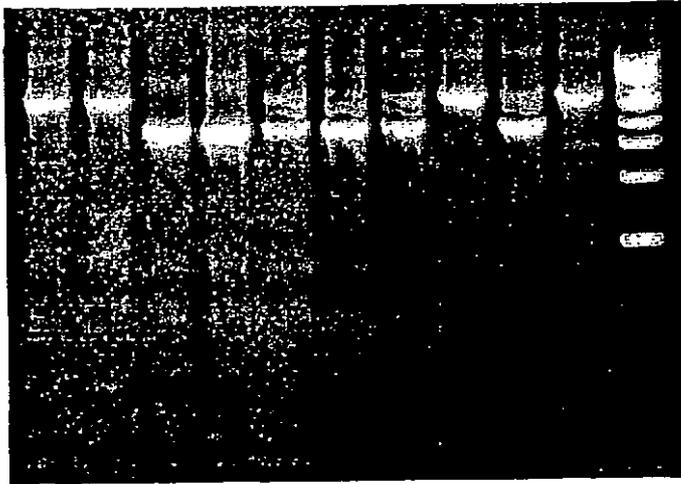


Fig. 3

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



Fig. 4

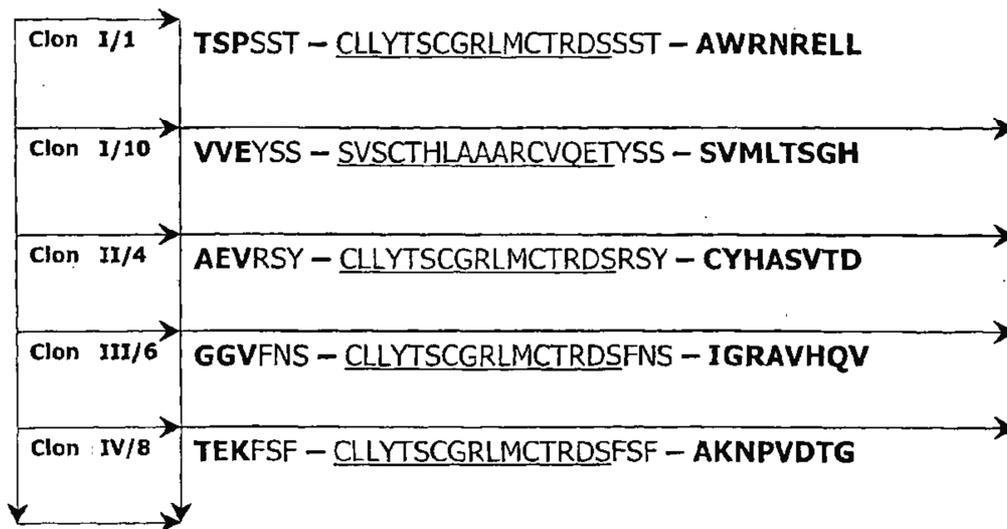


Fig. 5

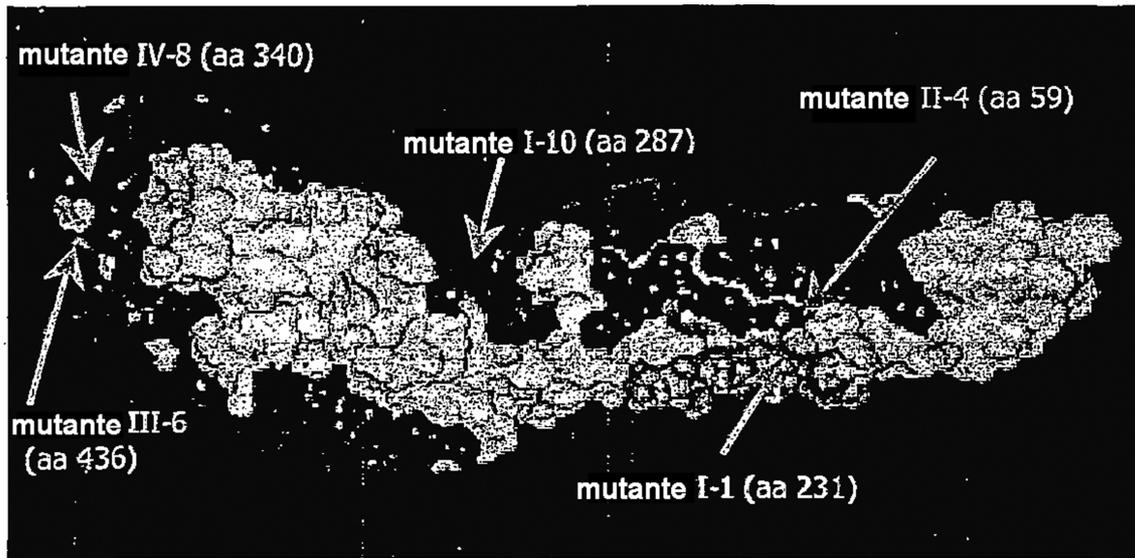


Fig. 6

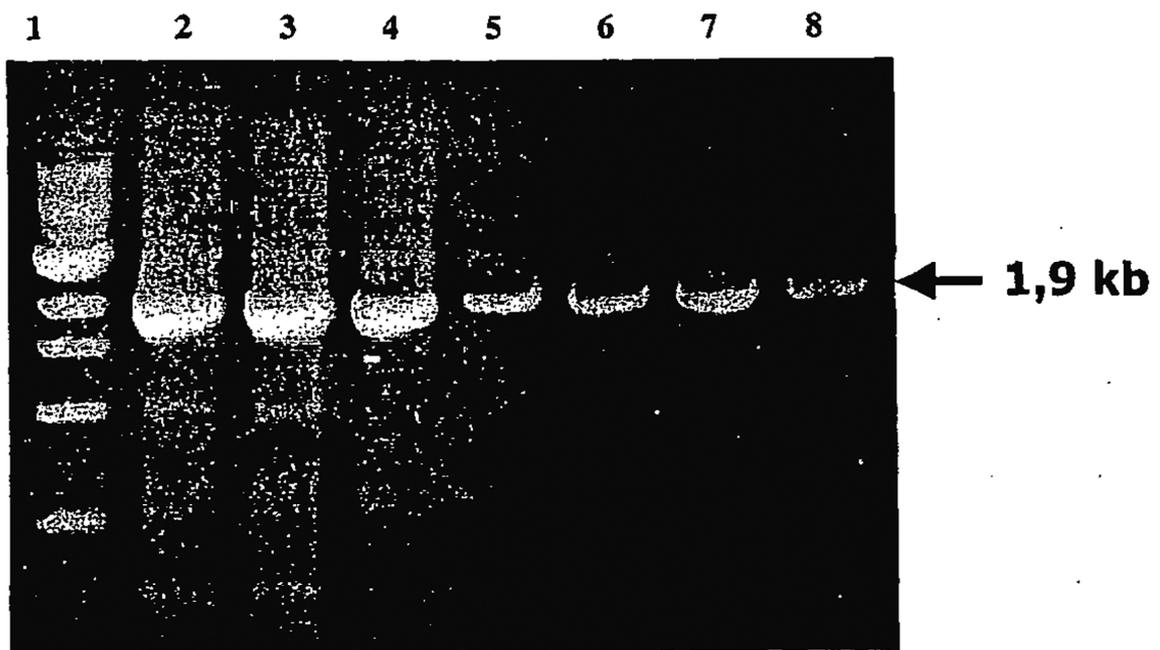


Fig. 7

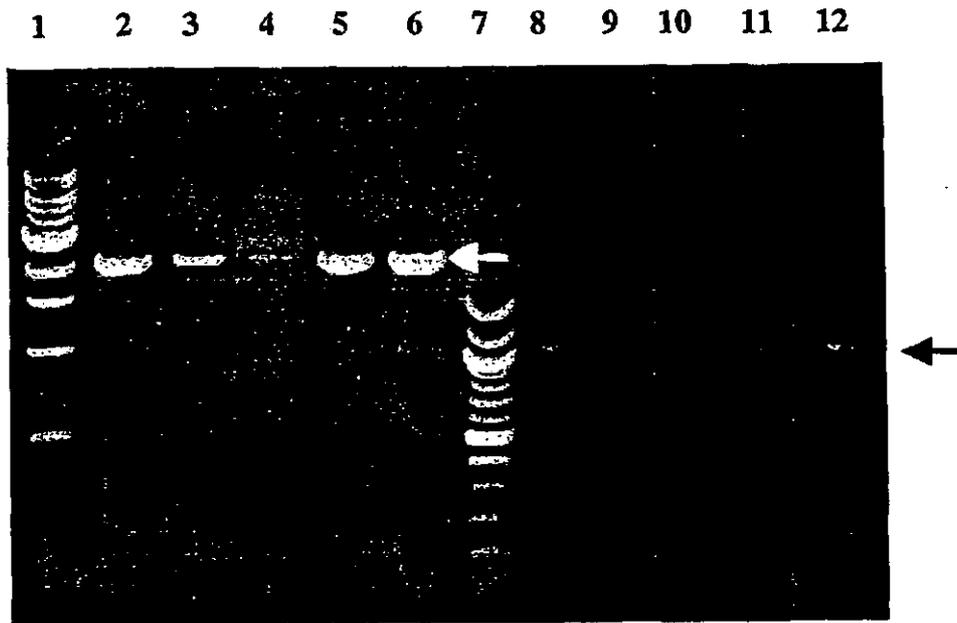


Fig. 9



Fig. 10

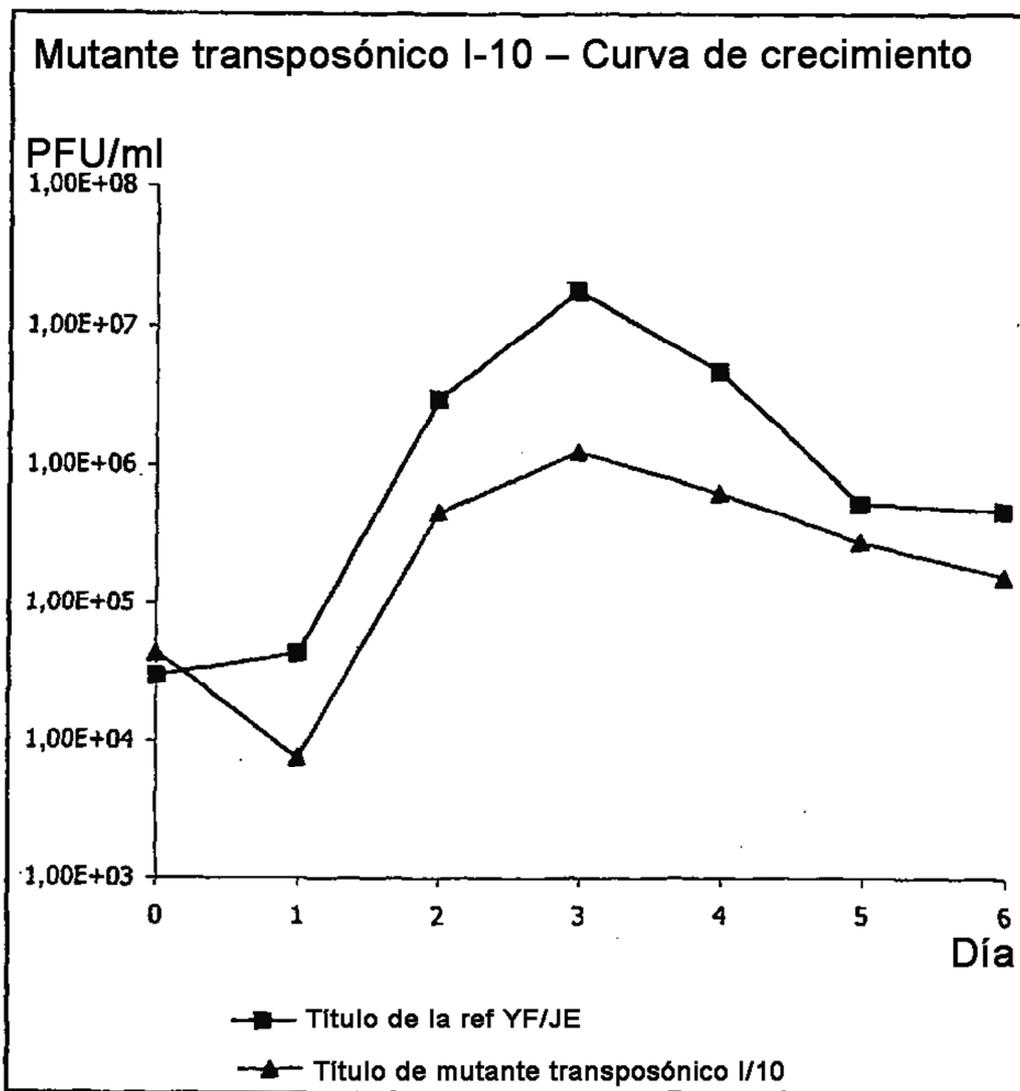


Fig. 11

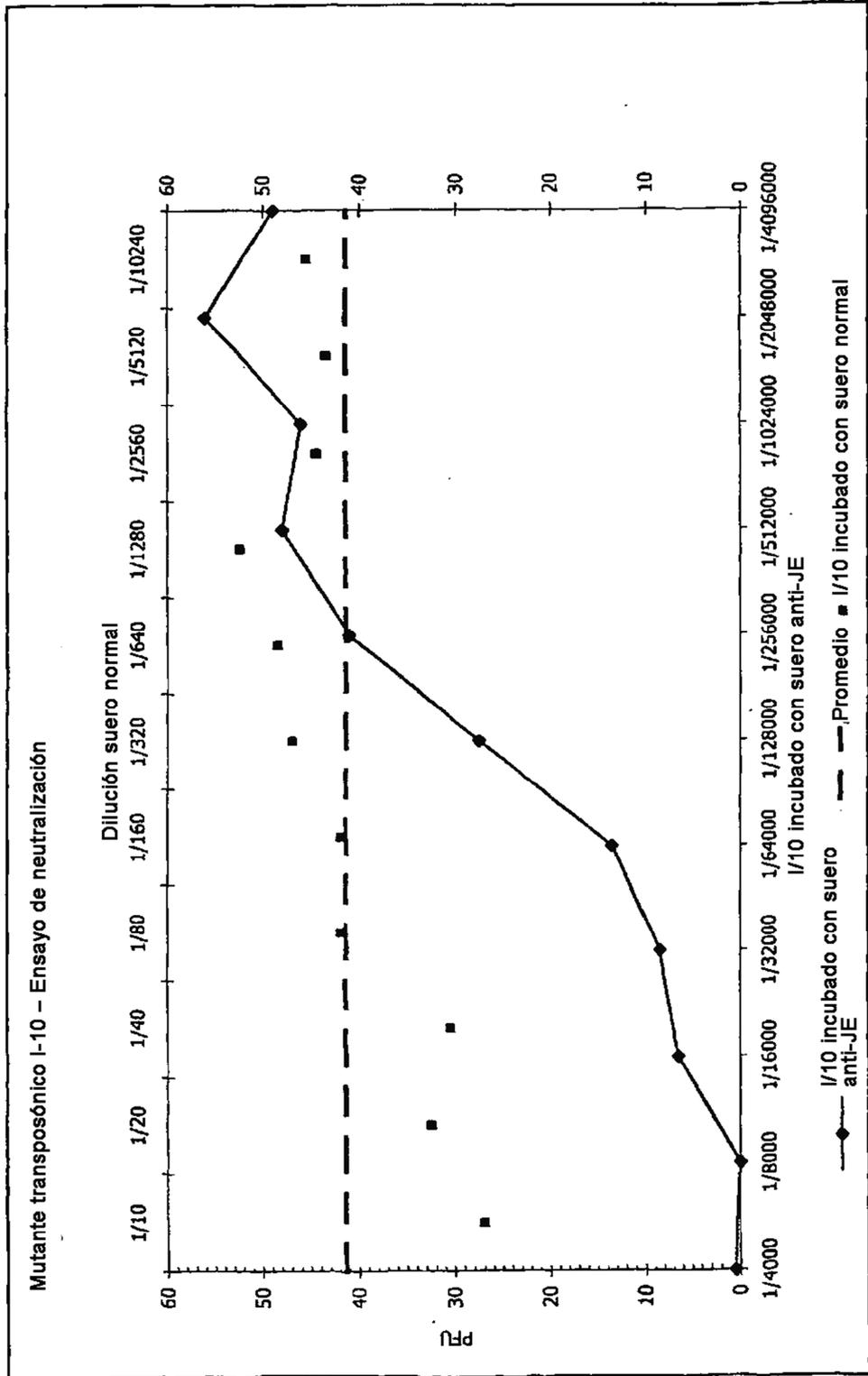


Fig. 12

