

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 310**

51 Int. Cl.:

C12N 7/04 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2005 E 05763601 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 1756287**

54 Título: **Atenuación sinérgica del virus de la estomatitis vesicular, vectores del mismo y composiciones inmunogénicas del mismo**

30 Prioridad:

09.04.2004 US 561214 P

19.01.2005 US 644902 P

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

07.05.2015

73 Titular/es:

WYETH LLC (100.0%)

235 East 42nd Street

New York, NY 10017-5755, US

72 Inventor/es:

CLARKE, DAVID, KIRKWOOD;

HENDRY, ROGER, MICHAEL;

UDEM, STEPHEN, A. y

PARKS, CHRISTOPHER, LEE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 535 310 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

Atenuación sinérgica del virus de la estomatitis vesicular, vectores del mismo y composiciones inmunogénicas del mismo

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere generalmente a los campos de la virología, la microbiología, las enfermedades infecciosas y la inmunología. Más particularmente, la invención se refiere a la atenuación sinérgica del virus de la estomatitis vesicular y a vectores del mismo mediante la combinación de diferentes clases de mutaciones.

Antecedentes de la invención

- 10 El virus de la estomatitis vesicular (VSV), un miembro de la familia Rhabdoviridae, tiene un genoma de ARN monocatenario no segmentado y de sentido negativo. Su genoma de once kb tiene cinco genes que codifican cinco proteínas estructurales del virus, la proteína de la nucleocápside (N), que se requiere en cantidades estequiométricas para la encapsidación del ARN replicado; la fosfoproteína (P), que es un cofactor de la ARN polimerasa dependiente de ARN (L); la proteína de la matriz (M) y la glicoproteína de unión (G) (por ejemplo, véase Gallione y col., 1981, Rose y Gallione, 1981; Rose y Schubert, 1987 y Schubert y col., 1985; patente de EE.UU. 6.033.886; patente de EE.UU. 6.168.943).

- 15 El VSV es un virus transmitido por artrópodos que se puede transmitir a varios huéspedes mamíferos, principalmente a ganado vacuno, caballos, cerdos y roedores. La infección por el VSV de seres humanos no es frecuente y en general es asintomática o se caracteriza por síntomas leves similares a los de la gripe que desaparecen en de tres a ocho días sin complicaciones. Dado que el VSV no se considera un patógeno humano y la inmunidad preexistente al VSV es infrecuente en la población de seres humanos, el desarrollo de vectores derivados del VSV ha sido un foco de atención en áreas tales como la de las composiciones inmunogénicas y la terapia génica. Por ejemplo, en estudios se ha establecido que el VSV puede servir como un vector muy eficaz para composiciones inmunogénicas que expresan la hemaglutinina del virus de la gripe (Roberts y col., 1999), la proteína H del virus del sarampión (Schlereth y col., 2000) y las proteínas env y gag del VIH-1 (Rose y col., 2001). Otras características del VSV que lo convierten en un vector atractivo incluyen: (a) la capacidad para replicarse sólidamente en cultivo celular; (b) la incapacidad de integrarse en el ADN de la célula huésped o sufrir recombinación genética; (c) la existencia de múltiples serotipos, lo que permite la posibilidad de estrategias de inmunización de sensibilización-refuerzo; (d) se pueden insertar genes de interés extraños en el genoma del VSV y se expresan abundantemente mediante la transcriptasa viral; y (e) el desarrollo de un sistema altamente especializado para el rescate de virus infecciosos a partir de una copia de ADNc del genoma del virus (patente de EE.UU. 6.033.886; patente de EE.UU. 6.168.943).

- 20 Aunque existen pocas pruebas de la afectación neurológica por el VSV durante la infección natural, los animales (por ejemplo, primates, roedores, animales de rebaño) a los que se inoculan por vía intracerebral (y en el caso de los roedores, intranasal) con el virus salvaje, el virus salvaje que ha pasado por cerebro de ratón o cultivo celular adaptado al virus salvaje, pueden desarrollar signos clínicos de la enfermedad y normalmente mueren de dos a ocho días después de la inoculación. Debido a estas observaciones y a la necesidad de producir un vector para composiciones inmunogénicas para usar en seres humanos que tenga un perfil de seguridad excepcional, los vectores del VSV en desarrollo se analizan en modelos rigurosos de neurovirulencia en primates y animales pequeños. Estas pruebas están diseñadas para detectar cualquier virulencia residual en vectores del VSV atenuado antes de considerarlos para avanzar a ensayos clínicos humanos.

- 25 La atenuación de los vectores de VSV prototipos fue el resultado de la acumulación de múltiples sustituciones de nucleótidos a lo largo del genoma del virus durante el pase en serie *in vitro* y la síntesis y ensamblaje del ADNc del genoma. Estas mutaciones tenían efectos pleiotrópicos que hicieron al virus menos patogénicos en ratones que en los virus adaptados de laboratorio del que se obtuvo (por ejemplo, véase Roberts y col., 1998). También se desarrollaron otros vectores de VSV atenuados mediante truncamiento de la región de cola citoplasmática de la proteína G del virus, lo que conduce a mutantes del VSV que eran defectuosos en la formación de yemas en la membrana plasmática de células infectadas (Schnell y col., 1998).

- 30 La solicitud de patente internacional publicada WO 98/50529 describe mutantes del VSV que se han atenuado mediante barajado génico (reordenamiento del orden de los genes), incluyendo el cambio de sitio del gen N a una posición más distal en 5' en el genoma.

- 35 Flanagan y col., "Gene Rearrangement Alters the Neuropathogenesis of VSV", J. Virol., 77(10):5740 - 5748, 2003, describe la atenuación del VSV cambiando de sitio el gen N a una posición más distal en 5' en el genoma y tiene como resultado la eliminación rápida del virus cuando se introduce en los cerebros de ratones, de modo que produce poca o ninguna neuropatogenia.

- 40 Roberts y col., "Vaccination with a Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Expressing an Influenza Virus Hemagglutinin Provides Complete Protection from Influenza Virus Challenge", J. Virol., 73:3723 - 3732, 1999, describe la construcción de un VSV con un truncamiento del dominio citoplasmático de la proteína G y la inserción el

gen que expresa la HA de la gripe. El VSV se atenuó y proporcionó a los ratones protección frente a la exposición al virus letal de la gripe.

Los vectores del VSV conocidos en la actualidad, supuestamente atenuados o no, han tenido niveles inaceptables de virulencia relativa cuando se analizan en modelos de neurovirulencia animales y primates no humanos. El desarrollo de un vector del VSV para usos tales como un vector para composiciones inmunogénicas, un vector de terapia génica y similares, requerirá vectores del VSV que tienen niveles mínimos o no detectables de patogenicidad en modelos de neurovirulencia animal. Por tanto, actualmente existe la necesidad en la técnica de vectores virales para identificar mutantes del VSV atenuados modificados genéticamente que tienen una patogenicidad significativamente reducida (o eliminada) en mamíferos.

10 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere en sentido amplio a la atenuación sinérgica del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Más particularmente, la invención se refiere a la identificación de clases de mutación combinadas que atenúan sinérgicamente la patogenicidad de los vectores del VSV en mamíferos y composiciones inmunogénicas de los mismos.

15 Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la invención está dirigida a un VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma, en el que las dos mutaciones atenúan de forma sinérgica la patogenicidad del VSV. En una realización particular, la patogenicidad del VSV se define además como neurovirulencia. En otra realización, las clases de mutaciones son una mutación sensible a la temperatura (ts), una mutación puntual, una mutación de barajado génico de N, una mutación no citopática en el gen M, una mutación en el ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación por inserción del gen G y una mutación génica por delección.

En una realización particular, las dos mutaciones del VSV son una mutación del gen G truncado (en lo sucesivo, "G_(ct)") y una mutación por barajado génico de N (es decir, el gen N se aleja de su primera posición proximal al promotor en 3' salvaje a una posición más distal en el orden de los genes del VSV). En otra realización, la proteína G del VSV codificada por el gen truncado G tiene una delección en los últimos veinte aminoácidos en el extremo carboxi (en lo sucesivo, "G_(ct-9)"). En otra realización más, la proteína G del VSV codificada por el gen truncado G tiene una delección en los últimos veintiocho aminoácidos en el extremo carboxi (en lo sucesivo, "G_(ct-1)"). En otra realización más, el gen N del VSV se baraja a 3'-PNMGL-5' o 3'-PMNGL-5' con respecto al 3'-NPMGL-5' en el genoma del VSV salvaje, en el que N es el gen que codifica la proteína de la nucleocápside, P es el gen que codifica la fosfoproteína, M es el gen que codifica la proteína de la matriz, G es el gen que codifica la glicoproteína de unión y L es el gen que codifica la proteína ARN polimerasa dependiente de ARN. En ciertas realizaciones, el VSV comprende un genoma mutado de 3'-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-5' o 3'-PMNG_(ct-9)L-5', en el que N es el gen que codifica la proteína de la nucleocápside, P es el gen que codifica la fosfoproteína, M es el gen que codifica la proteína de la matriz, G_(ct-1) es el gen que codifica la glicoproteína de unión que tienen una región de cola citoplasmática que consiste en un aminoácido, G_(ct-9) el gen que codifica la glicoproteína de unión que tiene una región de cola citoplasmática que consiste en nueve aminoácidos y L es el gen que codifica la proteína ARN polimerasa dependiente de ARN. En una realización particular, el genoma del VSV mutado es 3'-PMNG_(ct-1)L-5'. En otra realización particular, el genoma del VSV mutado es 3'-PNMG_(ct-1)L-5'. En otra realización, el VSV comprende además una tercera clase de mutación en su genoma, en el que la mutación es una mutación ts, una mutación puntual, una mutación de ARN ambisentido, una inserción del gen G, una delección del gen o una mutación no citopática en el gen M.

En determinadas realizaciones, el VSV modificado inyectado por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad tiene una DL₅₀ 100 veces mayor que el VSV salvaje inyectado por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad. En otras determinadas realizaciones, el VSV inyectado por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad tiene una DL₅₀ 1.000 veces mayor que el VSV salvaje inyectado por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad. En determinadas realizaciones adicionales, el VSV inyectado por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad tiene una DL₅₀ 10.000 veces mayor que el VSV salvaje inyectado por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad. En todavía otras determinadas realizaciones, el VSV inyectado por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad tiene una DL₅₀ 100.000 veces mayor que el VSV salvaje inyectado por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad.

En otra realización, la invención está dirigida a un vector del VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma y al menos una secuencia de ARN extraño como una unidad transcripcional independiente insertada en o en sustitución de una región del genoma del VSV no esencial para la replicación, en el que las dos mutaciones atenúan sinérgicamente la patogenicidad del VSV. Como se más adelante define en el presente documento, una secuencia de "ARN extraño" es cualquier secuencia de polinucleótidos que no endógena del genoma del VSV salvaje. En una realización particular, la patogenicidad del vector se define además como neurovirulencia. En otras determinadas realizaciones, el ARN extraño se define como un marco de lectura abierto (ORF). En otras determinadas realizaciones, las clases de mutaciones se seleccionan del grupo que consiste en una mutación ts, una mutación puntual, una mutación de barajado génico, una mutación

no citopática en el gen M, una mutación en el ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación por inserción del gen G y una mutación génica por delección.

En una realización concreta, las dos mutaciones del vector del VSV son una mutación en el G truncado y una mutación de barajado del gen N. En otra realización, la proteína G codificada por el gen G truncado tiene una delección de los últimos veinte aminoácidos en el extremo carboxi o una delección de los últimos veintiocho aminoácidos en el extremo carboxi. En otras determinadas realizaciones, el gen N del vector del VSV se baraja a 3'-PNMGL-5' o 3'-PMNGL-5' con respecto al 3'-NPMGL-5' del genoma del VSV salvaje. En una realización concreta, el vector del VSV comprende un genoma mutado de 3'-PMNG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-5' o 3'-PMNG_(ct-9)L-5'. En una realización concreta, el genoma del vector mutado es 3'-PMNG_(ct-1)L-5'. En otra realización, el genoma del vector mutado es 3'-PNMG_(ct-1)L-5'.

En otras realizaciones más, el vector del VSV comprende además una tercera clase de mutación en su genoma, en el que la mutación es una mutación ts, una mutación puntual, una mutación de ARN ambisentido, una mutación por inserción del gen G, una mutación por delección del gen o una mutación no citopática en el gen M. En otras determinadas realizaciones, el VSV inyectado por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad tiene una DL₅₀ 100 veces mayor que el VSV salvaje inyectado por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad. En otras realizaciones adicionales, el VSV modificado inyectado por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad tiene una DL₅₀ 1.000 veces mayor que el VSV salvaje inyectado por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad. En todavía otras determinadas realizaciones, el VSV inyectado por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad tiene una DL₅₀ 10.000 veces mayor que el VSV salvaje inyectado por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad. En otra realización, el VSV inyectado por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad tiene una DL₅₀ 100.000 veces mayor que el VSV salvaje inyectado por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad.

En otras determinadas realizaciones, el ARN extraño insertado en o sustituyendo una región del genoma del VSV no esencial para la replicación se selecciona del grupo que consiste en un gen del VIH, un gen del HTLV, un gen del SIV, un gen del RSV, un gen del PIV, un gen del HSV, un gen del CMV, un gen del virus de Epstein-Barr, un gen del virus de varicela zóster, un gen del virus de la parotiditis, un gen del virus del sarampión, un gen del virus de la gripe, un gen del poliovirus, un gen del rinovirus, un gen del virus de la hepatitis A, un gen del virus de la hepatitis B, un gen del virus de la hepatitis C, un gen del virus Norwalk, un gen del togavirus, un gen del alfavirus, un gen del virus de la rubéola, un gen del virus de la rabia, un gen del virus Marburg, un gen del virus ébola, un gen del virus del papiloma, un gen del virus del polioma, un gen del metapneumovirus, un gen del coronavirus, un gen de *Vibrio cholerae*, un gen de *Streptococcus pneumoniae*, un gen de *Streptococcus pyogenes*, un gen de *Streptococcus agalactiae*, un gen de *Neisseria meningitidis*, un gen de *Neisseria gonorrhoeae*, un gen de *Corynebacteria diphtheria*, un gen de *Clostridium tetani*, un gen de *Bordetella pertussis*, un gen de *Helicobacter pylori*, un gen de *Haemophilus Chlamydia*, un gen de *Escherichia coli*, un gen de citocinas, un epítipo de los linfocitos T colaboradores, un epítipo de CTL, un gen adyuvante y un gen de cofactor. En una realización particular, el ARN extraño es un gen del VIH seleccionado del grupo que consiste en *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* y *vpu*. En una realización particular, el gen del VIH es *gag*, en el que el gen *gag* se inserta en el genoma del VSV en la posición uno o en la posición cinco.

En otra realización, el ARN extraño expresa un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a tumor, para la inducción de una respuesta inmunológica protectora contra un tumor (por ejemplo, un tumor maligno). Dichos antígenos específicos de tumores o asociados a tumores incluyen, entre otros, el antígeno de pancarcinoma KS 1/4; el antígeno de carcinoma de ovarios (CA125); fosfato ácido prostático; el antígeno específico de la próstata; el antígeno p97 asociado al melanoma; el antígeno gp75 del melanoma; el antígeno de melanoma de alto peso molecular y el antígeno de membrana específico de la próstata.

Como se expone a continuación en la Sección A.1, la inserción de una secuencia de ácido nucleico extraño (por ejemplo, *gag* del VIH) en 3' del genoma de VSV a cualquiera de los genes N, P, M, G o L tiene como resultado eficazmente una "mutación por barajado génico". En otras realizaciones, el vector del VSV comprende además una tercera clase de mutación en su genoma, en el que la mutación es una mutación puntual, una mutación ts, una mutación por barajado génico, una mutación no citopática en el gen M, una mutación en el ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación por inserción y una mutación por delección del gen.

En otra realización, la invención está dirigida a una composición inmunogénica que comprende una dosis inmunogénica de un vector del VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma y al menos una secuencia de ARN extraño como una unidad transcripcional independiente insertada en o en sustitución de una región del genoma del VSV no esencial para la replicación, en el que las dos mutaciones atenúan sinérgicamente la patogenicidad del VSV. En otra realización, las clases de mutaciones se seleccionan del grupo que consiste en una mutación ts, una mutación puntual, una mutación de barajado génico, una mutación no citopática en el gen M, una mutación en el ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación por inserción del gen G y una mutación génica por delección.

En determinadas realizaciones, las dos mutaciones del son una mutación del G truncado y una mutación de barajado del gen N. En realizaciones concretas, la proteína G codificada por el gen G truncado tiene un dominio de

cola citoplasmática que consiste en un aminoácido (G_(ct-1)) o un dominio de cola citoplasmática que consiste en nueve aminoácidos (G_(ct-9)). En otras realizaciones más, el gen N se baraja a 3'-PNMGL-5' o 3'-PMNGL-5' con respecto al 3'-NPMGL-5' del genoma del VSV salvaje. En determinadas realizaciones, el vector del VSV de la composición inmunogénica comprende un genoma mutado de 3'-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-5' o 3'-PMNG_(ct-9)L-5'. En una realización concreta, el genoma del vector mutado de la composición inmunogénica es 3'-PMNG_(ct-1)L-5'. En otra realización, el genoma del vector mutado es 3'-PNMG_(ct-1)L-5'. En otras realizaciones, el vector del VSV de la composición inmunogénica comprende además una tercera clase de mutación en su genoma, en el que la mutación es una mutación ts, una mutación de ARN ambisentido, una mutación puntual, una mutación del tallo de G, una mutación por inserción del gen G, una mutación por delección del gen o una mutación no citopática en el gen M.

En otras determinadas realizaciones, el ARN extraño insertado en el vector del VSV modificado genéticamente de la composición inmunogénica se selecciona del grupo que consiste en un gen del VIH, un gen del HTLV, un gen del SIV, un gen del RSV, un gen del PIV, un gen del HSV, un gen del CMV, un gen del virus de Epstein-Barr, un gen del virus de varicela zóster, un gen del virus de la parotiditis, un gen del virus del sarampión, un gen del virus de la gripe, un gen del poliovirus, un gen del rinovirus, un gen del virus de la hepatitis A, un gen del virus de la hepatitis B, un gen del virus de la hepatitis C, un gen del virus Norwalk, un gen del togavirus, un gen del alfavirus, un gen del virus de la rubéola, un gen del virus de la rabia, un gen del virus Marburg, un gen del virus ébola, un gen del virus del papiloma, un gen del virus del polioma, un gen del metapneumovirus, un gen del coronavirus, un gen de *Vibrio cholerae*, un gen de *Streptococcus pneumoniae*, un gen de *Streptococcus pyogenes*, un gen de *Streptococcus agalactiae*, un gen de *Neisseria meningitidis*, un gen de *Neisseria gonorrhoeae*, un gen de *Corynebacteria diphtheria*, un gen de *Clostridium tetani*, un gen de *Bordetella pertussis*, un gen de *Helicobacter pylori*, un gen de *Haemophilus Chlamydia*, un gen de *Escherichia coli*, un gen de citocinas, un epítipo de los linfocitos T colaboradores, un epítipo de CTL, un gen adyuvante y un gen de cofactor. En una realización particular, el ARN extraño codifica una proteína del VIH seleccionada del grupo que consiste en *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* y *vpu*. En una realización particular, el gen del VIH es *gag*, en el que el gen *gag* se inserta en el genoma del VSV en la posición uno o en la posición cinco del genoma. En otra realización, el vector del VSV de la composición inmunogénica comprende un genoma mutado de 3'-*gag*₁-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-*gag*₁-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-*gag*₁-PMNG_(ct-1)L-5', 3'-*gag*₁-PMNG_(ct-9)L-5', 3'-PNMG_(ct-1)L*gag*₅-5', 3'-PNMG_(ct-9)L*gag*₅-5', 3'-PMNG_(ct-1)L*gag*₅-5' o 3'-PMNG_(ct-9)L*gag*₅-5'.

En otra realización, la mutación M_(ncp) es una mutación de metionina a alanina en la posición 33 (M33A) y una mutación de metionina a alanina en la posición (M51A) de la proteína M. En otras realizaciones más, el vector del VSV de la composición inmunogénica comprende además una tercera clase de mutación en su genoma, en el que la mutación es una mutación ts, una mutación puntual, una mutación por barajado génico, una mutación de ARN ambisentido, una mutación por inserción del gen G y una mutación por delección génica. En otras realizaciones adicionales, el ARN extraño insertado en el vector del VSV modificado genéticamente de la composición inmunogénica se selecciona del grupo que consiste en un gen del VIH, un gen del HTLV, un gen del SIV, un gen del RSV, un gen del PIV, un gen del HSV, un gen del CMV, un gen del virus de Epstein-Barr, un gen del virus de varicela zóster, un gen del virus de la parotiditis, un gen del virus del sarampión, un gen del virus de la gripe, un gen del poliovirus, un gen del rinovirus, un gen del virus de la hepatitis A, un gen del virus de la hepatitis B, un gen del virus de la hepatitis C, un gen del virus Norwalk, un gen del togavirus, un gen del alfavirus, un gen del virus de la rubéola, un gen del virus de la rabia, un gen del virus Marburg, un gen del virus ébola, un gen del virus del papiloma, un gen del virus del polioma, un gen del metapneumovirus, un gen del coronavirus, un gen de *Vibrio cholerae*, un gen de *Streptococcus pneumoniae*, un gen de *Streptococcus pyogenes*, un gen de *Helicobacter pylori*, un gen de *Streptococcus agalactiae*, un gen de *Neisseria meningitidis*, un gen de *Neisseria gonorrhoeae*, un gen de *Corynebacteria diphtheria*, un gen de *Clostridium tetani*, un gen de *Bordetella pertussis*, un gen de *Haemophilus*, un gen de *Chlamydia*, un gen de *Escherichia coli*, un gen que codifica una citocina, un gen que codifica un epítipo de los linfocitos T colaboradores, un gen que codifica un epítipo de CTL, un gen que codifica un adyuvante y un gen que codifica un cofactor. En determinadas realizaciones, el gen del VIH seleccionado del grupo que consiste en *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* o *vpu*.

En otra realización más, una composición inmunogénica de la invención se administra por cualquier vía convencional seleccionada del grupo que consiste en intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, oral, rectal, intranasal, bucal, vaginal y *ex vivo*.

En otra realización, la invención está dirigida a un procedimiento de inmunización de un sujeto mamífero contra la infección por VIH administrando al sujeto una dosis inmunogénica de un vector del VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma y al menos una secuencia de ARN del VIH como una unidad transcripcional separada insertada en o sustituyendo a una región del genoma del VSV no esencial para la replicación, en la que las dos mutaciones atenúan de forma sinérgica la patogenicidad del VSV y el ARN del VIH codifica un antígeno seleccionado del grupo que consiste en *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* y *vpu*. En determinadas realizaciones, el vector del VSV es 3'-*gag*₁-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-*gag*₁-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-*gag*₁-PMNG_(ct-1)L-5', 3'-*gag*₁-PMNG_(ct-9)L-5', 3'-PNMG_(ct-1)L*gag*₅-5', 3'-PNMG_(ct-9)L*gag*₅-5', 3'-PMNG_(ct-1)L*gag*₅-5', 3'-PMNG_(ct-9)L*gag*₅-5', 3'-*gag*₁-NPM_(ncp)G_(ct-1)L-5', 3'-*gag*₁-NPM_(ncp)G_(ct-9)L-5', 3'-NPM_(ncp)G_(ct-1)L*gag*₅-5', 3'-NPM_(ncp)G_(ct-9)L*gag*₅-5', 3'-*gag*₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' o 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-*gag*₅-5'.

En otras determinadas realizaciones, la invención está dirigida a un procedimiento de inmunización de un huésped

5 mamífero contra la infección bacteriana que comprende administrar una dosis inmunogénica de un vector del VSV modificado genéticamente que comprende (a) al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma, consistiendo las mutaciones seleccionadas del grupo en una mutación ts, una mutación puntual, una mutación por barajado génico, una mutación en el gen M no citopática, una mutación en ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación por inserción del gen G y una mutación por delección génica, en el que las dos mutaciones atenúan de forma sinérgica la patogenicidad del VSV y (b) al menos una secuencia de ARN extraño insertada en o sustituyendo a una región del genoma del VSV no esencial para la replicación, en el que el ARN codifica una proteína bacteriana seleccionada del grupo que consiste en una proteína de *Vibrio cholerae*, una proteína de *Streptococcus pneumoniae*, una proteína de *Streptococcus pyogenes*, una proteína de *Streptococcus agalactiae*, una proteína de *Helicobacter pylori*, una proteína de *Neisseria meningitidis*, una proteína de *Neisseria gonorrhoeae*, una proteína de *Corynebacteria diphtheriae*, una proteína de *Clostridium tetani*, una proteína de *Bordetella pertussis*, una proteína de *Haemophilus*, una proteína de *Chlamydia* y una proteína de *Escherichia coli*.

15 En una realización concreta, las dos mutaciones son una mutación G_(ct) y una mutación de barajado del gen N. En determinadas realizaciones, la proteína G codificada por el gen G truncado tiene un dominio de cola citoplasmática que consiste en un aminoácido (G_(ct-1)) o un dominio de cola citoplasmática que consiste en nueve aminoácidos (G_(ct-9)). En determinadas realizaciones más, el gen N se baraja a 3'-PNMGL-5' o 3'-PMNGL-5' con respecto al 3'-NPMGL-5' del genoma del VSV salvaje. En otras realizaciones, el genoma del VSV mutado es 3'-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-5' o 3'-PMNG_(ct-9)L-5'. En una realización concreta, el genoma mutado es 3'-PMNG_(ct-1)L-5' o 3'-PMNG_(ct-1)L-5'.

20 En otras realizaciones más, el VSV comprende además una tercera clase de mutación en su genoma, en el que la mutación es una mutación ts, una mutación puntual, una mutación de ARN ambisentido, una mutación por delección génica, una mutación en el tallo de G, una mutación por inserción del gen G, una mutación por inserción génica o una mutación no citopática en el gen M.

25 En otra realización, la invención está dirigida a un procedimiento de inmunización de un huésped mamífero contra infección viral que comprende administrar una dosis inmunogénica de un vector del VSV modificado genéticamente que comprende (a) al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma, consistiendo las mutaciones seleccionadas del grupo en una mutación ts, una mutación puntual, una mutación por barajado génico, una mutación en el gen M no citopática, una mutación en el ARN ambisentido, una mutación del gen G truncado, una mutación por inserción del gen G y una mutación por delección génica, en el que las dos mutaciones atenúan de forma sinérgica la patogenicidad del VSV y (b) al menos una secuencia de ARN extraño insertada en o sustituyendo a una región del genoma del VSV no esencial para la replicación, en el que el ARN codifica una proteína viral seleccionada del grupo que consiste en una proteína del VIH, una proteína del HTLV, una proteína del SIV, una proteína del RSV, una proteína del PIV, una proteína del HSV, una proteína del CMV, una proteína del virus de Epstein-Barr, una proteína del virus de varicela zóster, una proteína del virus del sarampión, una proteína del virus de la gripe, una proteína del poliovirus, una proteína de rinovirus, una proteína del virus de la hepatitis A, una proteína del virus de la hepatitis B, una proteína del virus de la hepatitis C, una proteína del virus Norwalk, una proteína del virus togavirus, una proteína del alfavirus, una proteína del virus de la rubéola, una proteína del virus de la rabia, una proteína del virus Marburg, una proteína del virus ébola, una proteína del virus del papiloma, una proteína del virus del polioma, una proteína del metapneumovirus y una proteína del coronavirus. En una realización particular, el ARN es un gen del VIH seleccionado del grupo que consiste en *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* o *vpu*.

35 En determinadas realizaciones, las dos mutaciones son una mutación G_(ct) y una mutación de barajado del gen N. En una realización concreta, el genoma del VSV mutado es 3'-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-5' o 3'-PMNG_(ct-9)L-5'. En otra realización, el gen del VIH es *gag*, en el que el gen *gag* se inserta en el genoma del VSV en la posición uno o en la posición cinco, en el que el genoma mutado es 3'-*gag*₁-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-*gag*₁-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-*gag*₁-PMNG_(ct-1)L-5', 3'-*gag*₁-PMNG_(ct-9)L-5', 3'-PNMG_(ct-1)L-*gag*₅-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-*gag*₅-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-*gag*₅-5' o 3'-PMNG_(ct-9)L-*gag*₅-5'. En otra realización, el VSV comprende además una tercera clase de mutación en su genoma, en el que la mutación es una mutación ts, una mutación puntual, una mutación de ARN ambisentido, una mutación por delección génica, una mutación en el tallo de G, una mutación por inserción del gen G, una mutación por inserción génica o una mutación en el gen M no citopática.

50 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, a partir de las realizaciones preferidas de la misma, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

55 La Figura 1 muestra la cinética de crecimiento (ufp/ml frente al tiempo) del VSV salvaje (3'-NPMGL-5'), mutantes del VSV con barajado de N (3'-PNMGL-5' [N2], 3'-PMNGL-5' [N3] y 3'PMGNL-5' [N4]), mutantes del VSV con truncamiento de la cola citoplasmática (ct) de la proteína G (3'-NPMG_(ct-9)L-5' [CT9] y 3'-NPMG_(ct-1)L-*gag*₅-5' [CT1-GAG5]) y mutantes combinados del VSV con N barajado/truncamiento de la ct de la proteína G (3'-PNMG_(ct-1)L-5' [N2CT1], 3'-PNMG_(ct-9)L-5' [N2CT9], 3'-PMNG_(ct-1)L-5' [N3CT1] y 3'-PMNG_(ct-9)L-5' [N3CT9]). La abreviatura "in" que se muestra en la leyenda de la figura en recuadro representa la cepa Indiana del VSV.

60 La Figura 2 es una comparación de la cinética del crecimiento de mutantes del VSV con N barajado (3'-PNMGL-5', 3'-PMNGL-5' y 3'-PMGNL-5') con respecto al VSV salvaje (3'-NPMGL-5') y la mutante del VSV de

ct-1 de la proteína G (3'-NPMG_(ct-9)L-gag₅-5').

La Figura 3 muestra una comparación de los índices de crecimiento de los mutantes combinados del VSV con barajado de N/ct-1 de la proteína G (3'-PNMG_(ct-1)L-5' y 3'-PMNG_(ct-1)L-5') respecto al VSV salvaje (3'-NPMGL-5') y un mutante del VSV de ct-1 de la proteína G (3'-NPMG_(ct-1)L-gag₅5').

5 **Descripción detallada de la invención**

La invención descrita en lo sucesivo en el presente documento aborda una necesidad en la técnica de vectores del virus de la estomatitis vesicular (VSV) que tengan una patogenicidad significativamente atenuada en mamíferos, en particular una neuropatogenicidad atenuada como se revela en modelos de neurovirulencia animal. Como se ha descrito anteriormente, el VSV tiene muchas características que lo convierten en un vector atractivo para composiciones inmunogénicas y/o terapia génica. Por ejemplo, la infección por VSV de seres humanos es poco frecuente y es asintomática o se caracteriza por síntomas leves similares a los de la gripe que desaparecen en de tres a ocho días sin complicaciones y, como tales, el VSV no se considera un patógeno humano. Otras características del VSV que lo convierten en un vector atractivo incluyen: (a) la capacidad para replicarse sólidamente en cultivo celular; (b) la incapacidad de integrarse en el ADN de la célula huésped o sufrir recombinación genética; (c) la existencia de múltiples serotipos, lo que permite la posibilidad de estrategias de inmunización de sensibilización-refuerzo; (d) se pueden insertar genes de interés extraños en el genoma del VSV y se expresan abundantemente mediante la transcriptasa viral; y (e) el desarrollo de un sistema altamente especializado para el rescate de virus infecciosos a partir de una copia de ADNc del genoma del virus (patente de EE.UU. 6.033.886; patente de EE.UU. 6.168.943) y (f) la inmunidad preexistente al VSV en la población humana es infrecuente.

Una clase temprana de vectores del VSV atenuados descritos en la técnica se denominaron mutantes sensibles a la temperatura (ts), en los que los mutantes ts no podían producir viriones a una temperatura restrictiva. Por ejemplo, en la técnica se conocen varios mutantes ts del VSV (por ejemplo, véase Holloway y col., 1970; Pringle y col., 1971; Evans y col., 1979; Pringle y col., 1981; Morita y col., 1987; Gopalakrishna y Lenard, 1985). Además, en la técnica también se han descrito otras clases de mutantes del VSV atenuados e incluyen mutaciones en la cola citoplasmática (ct) truncada de la proteína G del VSV (Schnell y col., 1998), mutaciones por barajado génico (o reordenación del orden de los genes) (Wertz y col., 1998; Ball y col., 1999; Flanagan y col., 2001; patente de EE.UU. 6.596.529), mutaciones en el tallo de G (Jeetendra y col., 2003; Jeetendra y col., 2002; Robinson y Whitt, 2000), mutaciones no citopáticas en la proteína M (Jayakar y col., 2000; Jayakar Y Whitt, 2002) y mutaciones en el ARN ambisentido (Finke y Conzelmann, 1997; Finke y Conzelmann 1999). No obstante, como se ha indicado anteriormente, los vectores del VSV atenuados disponibles actualmente retienen virulencia residual cuando se analizan en modelos animales y, como tales, no son probables candidatos a vectores para avanzar a ensayos clínicos humanos.

Como se expone con detalle en el presente documento, la presente invención se refiere a observaciones inesperadas y sorprendentes de que las combinaciones de dos o más clases de mutaciones atenuantes conocidas (mutaciones por barajado génico, mutaciones por inserción y truncamiento de la proteína G, mutaciones ts y otras mutaciones puntuales, mutaciones no citopáticas en el gen M, mutaciones de ARN ambisentido, mutaciones por delección génica y similares) tienen un efecto sinérgico (en contraste con un efecto aditivo) sobre el nivel resultante de atenuación de la patogenicidad alcanzada. Por ejemplo, en el presente documento se demuestra que los mutantes por truncamiento de la proteína G del VSV, cuando se combinan con mutantes por barajado del gen N, ejercían una atenuación sinérgica del crecimiento del VSV (Ejemplo 2) y neurovirulencia (Ejemplo 3). Además, determinadas realizaciones de la presente invención están dirigidas a combinaciones de otras clases de mutaciones, que también tienen un efecto sinérgico sobre la atenuación del VSV. Dichas clases incluyen, entre otras: mutaciones ts, mutaciones puntuales, mutaciones por barajado génico (incluyendo barajados de los genes N, P, M, G y L), inserciones del gen G, mutaciones no citopáticas del gen M, mutaciones de truncamiento del gen G (por ejemplo, un mutante ct), mutaciones de ARN ambisentido y mutaciones por delección génica.

Por tanto, en determinadas realizaciones, la invención está dirigida a un vector del VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma y al menos una secuencia de ARN extraño como una unidad transcripcional independiente insertada en o en sustitución de una región del genoma del VSV no esencial para la replicación, en el que las dos mutaciones atenúan sinérgicamente la patogenicidad del VSV. En otras determinadas realizaciones, la invención está dirigida a composiciones inmunogénicas que comprenden un vector del VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma y al menos una secuencia de ARN extraño como una unidad transcripcional independiente insertada en o en sustitución de una región del genoma del VSV no esencial para la replicación, en el que las dos mutaciones atenúan sinérgicamente la patogenicidad del VSV.

A. CLASES DE MUTACIONES DEL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR

Como se ha indicado en lo que antecede, un vector del VSV modificado genéticamente de la invención comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma. Como se define en lo sucesivo en el presente documento, las expresiones "clase de mutación", "clases de mutación" o "clases de mutaciones" se usan de forma intercambiable y hacen referencia a mutaciones conocidas en la técnica, cuando se usan de forma independiente,

para atenuar el VSV. Por ejemplo, una "clase de mutación" de la invención incluye, entre otros, una mutación en el gen N del VSV sensible a la temperatura (en lo sucesivo en el presente documento "N_(ts)"), una mutación en el gen L sensible a la temperatura (en lo sucesivo en el presente documento "L_(ts)"), una mutación puntual, una mutación no citopática en el gen M (en lo sucesivo en el presente documento "M_(ncp)"), una mutación por barajado génico o reordenación, una mutación del gen G truncado (en lo sucesivo en el presente documento "G_(ct)"), una mutación en el ARN ambisentido, una mutación por inserción en el gen G, una mutación por delección génica y similares. Como se define a continuación en el presente documento, una "mutación" incluye mutaciones conocidas en la técnica como inserciones, deleciones, sustituciones, reordenación génica o modificaciones por barajado.

Como se define a continuación en el presente documento, el término atenuación "sinérgica" hace referencia a un nivel de atenuación del VSV que es superior al aditivo. Por ejemplo, una atenuación sinérgica del VSV de acuerdo con la presente invención comprende combinar al menos dos clases de mutación en el mismo genoma del VSV, de modo que se produce una reducción de la patogenicidad del VSV mucho mayor que un nivel de atenuación aditiva observado para cada clase de mutación del VSV independiente. Por tanto, en determinadas realizaciones, una atenuación sinérgica del VSV se define como una DL₅₀ al menos mayor que el nivel de atenuación aditiva observado para clase de mutación independiente (es decir, la suma de las dos clases de mutación), en la que los niveles de atenuación (es decir, la DL₅₀) se determinan en un modelo de neurovirulencia en animales pequeños.

A modo de ejemplo no limitante, si la ecuación (1) describe una "atenuación aditiva" del VSV:

$$(1) \Delta a_{DL50} + \Delta b_{DL50} = X_{DL50}$$

en la que Δa_{DL50} es la DL₅₀ de un VSV que tiene una primera clase de mutación en su genoma, Δb_{DL50} es la DL₅₀ de un VSV que tiene una segunda clase de mutación en su genoma y X_{DL50} es la suma de Δa_{DL50} y Δb_{DL50} ; después una "atenuación sinérgica" del VSV de la invención, que tiene una DL₅₀ al menos mayor que el nivel de atenuación aditiva observado para cada clase de mutación independiente, se describe mediante la ecuación (2):

$$a. \Delta a, b_{DL50} > (\Delta a_{DL50} + \Delta b_{DL50});$$

en la que $\Delta a, b_{DL50}$ es la DL₅₀ de un VSV que tiene una combinación de dos clases de mutación en su genoma, Δa_{DL50} es la DL₅₀ de un VSV que tiene una primera clase de mutación en su genoma y Δb_{DL50} es la DL₅₀ de un VSV que tiene una segunda clase de mutación en su genoma. Por tanto, en determinadas realizaciones, la sinergia del VSV de la atenuación del VSV (es decir, dos clases de mutación en el mismo genoma del VSV) se describe respecto a la DL₅₀ de dos construcciones del VSV (cada construcción del VSV que tiene una única clase de mutación en su genoma), en el que la atenuación sinérgica del VSV que tiene dos clases de mutación en su genoma se define como una DL₅₀ al menos mayor que la DL₅₀ aditiva de las dos construcciones del VSV que tiene una única clase de mutación en su genoma (por ejemplo, véanse los valores de DL₅₀ del VSV en la Tabla 7).

En otras determinadas realizaciones, la sinergia de la atenuación del VSV se describe con respecto a la DL₅₀ del VSV salvaje. Por tanto, en una realización, una atenuación sinérgica del VSV se define como una DL₅₀ que es al menos mayor que la DL₅₀ del VSV salvaje, en el que la DL₅₀ se determina en un modelo de neurovirulencia animal. Por tanto, en una realización, una atenuación sinérgica del VSV se define como una DL₅₀ que es al menos 10 veces mayor que la DL₅₀ del VSV salvaje, en el que la DL₅₀ se determina en un modelo de neurovirulencia animal. En otra realización, una atenuación sinérgica del VSV se define como una DL₅₀ que es al menos 100 veces mayor que la DL₅₀ del VSV salvaje, en el que la DL₅₀ se determina en un modelo de neurovirulencia animal. En otra realización, una atenuación sinérgica del VSV se define como una DL₅₀ que es al menos 1.000 veces mayor que la DL₅₀ del VSV salvaje, en el que la DL₅₀ se determina en un modelo de neurovirulencia animal. En aún otras realizaciones, una atenuación sinérgica del VSV se define como una DL₅₀ que es al menos 10.000 veces mayor que la DL₅₀ del VSV salvaje, en el que la DL₅₀ se determina en un modelo de neurovirulencia animal. En determinadas otras realizaciones, una atenuación sinérgica del VSV se define como una DL₅₀ que es al menos 100.000 veces mayor que la DL₅₀ del VSV salvaje, en el que la DL₅₀ se determina en un modelo de neurovirulencia animal. Un experto en la técnica determina fácilmente la determinación de una dosis letal al 50 % (LD₅₀) para un vector concreto del VSV usando procedimientos de ensayo y modelos animales conocidos (por ejemplo, véase el Ejemplo 1).

Por tanto, en determinadas realizaciones, la invención está dirigida a un VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones expuestas a continuación.

1. Mutaciones por barajado génico

En determinadas realizaciones, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende una mutación por barajado génico en su genoma. Como se define en el presente documento, las expresiones "barajado génico", "gen barajado", "barajado", "reordenación génica" y "translocación génica" se usan de forma intercambiable y hacen referencia a un cambio (mutación) en el orden del genoma del VSV salvaje. Como se define en el presente documento, un genoma del VSV salvaje tiene el orden génico siguiente: 3'-NPMGL-5'.

En la técnica es conocido que la posición de un gen del VSV respecto al promotor en 3' determina el nivel de expresión y atenuación vírica (patente de EE.UU. 6.596.529 y Wertz y col., 1998). Las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas G, M, N, P y L del VSV se conocen en la técnica (Rose y Gallione, 1981; Gallione y col.,

1981). Por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.596.529 describe mutaciones por barajado génico en las que el gen para la proteína N se transloca (baraja) de su primera posición proximal al promotor salvaje a posiciones sucesivamente más distales en el genoma (por ejemplo, 3'-PNMGL-5', 3'-PMNGL-5', 3'-PMGNL-5', denominados N2, N3 y N4, respectivamente). Por tanto, en determinadas realizaciones, un VSV modificado genéticamente comprende una mutación por barajado génico en su genoma. En una clase de mutación, en una realización concreta, un VSV modificado genéticamente comprende una mutación por barajado génico que comprende una translocación del gen N (por ejemplo, 3'-PNMGL-5' o 3'-PMNGL-5').

Cabe destacar en el presente documento que la inserción de una secuencia de ácido nucleico extraño (por ejemplo, gag del VIH) en 3' del genoma de VSV a cualquiera de los genes N, P, M, G o L tiene como resultado eficazmente una "mutación por barajado génico" como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, cuando el gen *gag* del VIH se inserta en el genoma del VSV en la posición uno (por ejemplo, 3'-gag₁-NPMGL-5'), los genes N, P, M, G y L se mueven cada uno desde sus posiciones salvajes a posiciones más distales en el genoma. Por tanto, en determinadas realizaciones de la invención, una mutación por barajado génico incluye la inserción de una secuencia de ácido nucleico extraño en el genoma del VSV en 3' de uno de los genes N, P, M, G o L (por ejemplo, 3'-gag₁-NPMGL-5', 3'-N-gag₂-PMGL-5', 3'-NP-gag₃-MGL-5', etc.).

2. Mutantes de inserción y truncamiento de la proteína g

En otras determinadas realizaciones, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende un gen G mutado, en el que la proteína G codificada está truncada en su dominio citoplasmático (extremo carboxi), también denominada "región de la cola citoplasmática" de la proteína G. En la técnica es conocido que las mutaciones en el gen G que truncan el extremo carboxi del dominio citoplasmático influyen en la gemación del VSV y atenúan la producción de virus (Schnell y col., 1998; Roberts y col., 1999). El dominio citoplasmático de la proteína G del VSV salvaje comprende veintinueve aminoácidos (RVGIHLCLIKLTKKRQIYTDIEMNRLGK-COOH; SEC ID N° 1).

En determinadas realizaciones, un gen G del VSV truncado de la invención codifica una proteína G en la que se delecionan los últimos veintiocho residuos de aminoácidos en el extremo carboxi del dominio citoplasmático (que conservan solo la arginina del dominio citoplasmático salvaje de veintinueve aminoácidos de la SEC ID N° 1). En determinadas otras realizaciones, un gen G del VSV truncado de la invención codifica una proteína G en la que se delecionan los últimos veinte residuos de aminoácidos en el extremo carboxi del dominio citoplasmático (respecto al dominio citoplasmático salvaje de veintinueve aminoácidos de la SEC ID N° 1).

En otras determinadas realizaciones, un gen G truncado del VSV de la invención codifica una proteína G que comprende un único aminoácido en su dominio citoplasmático (región de cola citoplasmática), en el que el único aminoácido es cualquier aminoácido de origen natural. En determinadas realizaciones adicionales, un gen G truncado del VSV de la invención codifica una proteína G que comprende nueve aminoácidos en su dominio citoplasmático (región de cola citoplasmática), en el que los nueve aminoácidos son cualquier aminoácido de origen natural. En otras determinadas realizaciones, un gen del VSV mutado de la invención codifica una proteína G que contiene una inserción que representa un epítipo extraño. En la técnica se conocen dichos mutantes (por ejemplo, véase Schlehuber y Rose, 2003).

Como se define en el presente documento, un mutante del gen G que codifica una proteína G en la que los últimos veintiocho residuos de aminoácidos en el extremo carboxi del dominio citoplasmático se selecciona, respecto a la secuencia salvaje de la SEC ID N° 1, se designa "G_(ct-1)", en el que el dominio citoplasmático del G_(ct-1) tiene una secuencia de aminoácidos de (R-COOH). Como se define en el presente documento, un mutante del gen G que codifica una proteína G en la que los últimos veintiocho residuos de aminoácidos en el extremo carboxi del dominio citoplasmático se selecciona, respecto a la secuencia salvaje de la SEC ID N° 1, se designa "G_(ct-9)", en el que el dominio citoplasmático del G_(ct-9) tiene una secuencia de aminoácidos de (RVGIHLCLIK-COOH, SEC ID N° 2). Por tanto, en determinadas realizaciones de la invención, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende un gen G mutado, en el que la proteína G codificada es un G_(ct-1) o G_(ct-9).

3. Mutaciones sensibles a la temperatura y otras puntuales

Una mutación "sensible a la temperatura" ("ts") del VSV, como se define a continuación en el presente documento, es una mutación en el genoma del VSV que restringe el crecimiento del VSV a una temperatura no permisiva. Por ejemplo, un mutante ts del VSV de la invención crece normalmente y a un título alto a la temperatura permisiva (por ejemplo, 31 °C), pero su crecimiento o reproducción se restringe a temperaturas no permisivas (por ejemplo, 37 °C o 39 °C). La generación de los mutantes ts mediante mutagénesis química y dirigida a sitio es bien conocida en la técnica (por ejemplo, véase Pringle, 1970; Li y col., 1988); y numerosos mutantes ts se han caracterizado y descrito (por ejemplo, véase Flamand y Pringle, 1971; Flamand y Bishop, 1973; Printz y Wagner, 1971; Gopalakrishna y Lenard, 1985; Pringle y col., 1981; Morita y col., 1987; Li y col., 1988; Rabinowitz y col., 1977; Lundh y col., 1988; Dal Canto y col., 1976; Rabinowitz y col., 1976). En determinadas realizaciones, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende una mutación ts en su genoma, en el que la mutación ts es una o más mutaciones de una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína G, M, N, P o L.

Como se define en el presente documento, una mutación ts de uno cualquiera de los genes G, M, N, P o L del VSV es una "clase de mutación" individual de la invención. Por ejemplo, en determinadas realizaciones de la invención,

un VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases de mutaciones diferentes en su genoma (en el que las dos mutaciones atenúan de forma sinérgica la patogenicidad del VSV) comprende una o más mutaciones ts del gen N (en lo sucesivo en el presente documento, "N_(ts)") como primera clase de mutación y una o más mutaciones ts del gen L (en lo sucesivo en el presente documento, "L_(ts)") como segunda clase de mutación. Como ejemplo no limitante, un VSV modificado genéticamente que comprende un genoma tal como 3'-N_(ts)PMGL_(ts)-5' comprende dos clases de mutaciones (es decir, (1) una mutación génica N_(ts) y (2) una mutación génica L_(ts)) y un VSV modificado genéticamente que comprende un genoma tal como 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' comprende tres clases de mutaciones (es decir, (1) una mutación génica N_(ts), (2) una mutación génica L_(ts) y (3) mediante inserción de gag₁, una mutación por barajado génico).

En otras determinadas realizaciones, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende una mutación puntual en su genoma, en la que la mutación puntual es una o más mutaciones de una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína G, M, N, P o L, en la que la mutación confiere un fenotipo atenuante tal como adaptación al frío, disminución de la fusión o eficiencia citopatogénica (por ejemplo, véase Fredericksen y Whitt, 1998; Ahmed y Lyles, 1997). Por ejemplo, Fredericksen y Whitt (1998) describen tres mutaciones puntuales atenuantes del gen G (por ejemplo, D137-L, E139-L o DE-SS) que tienen un umbral del pH cambiado para la actividad de fusión. Ahmed y Lyles (1997) describieron una mutación puntual atenuante del gen M (N163D) que era altamente defectiva en la inhibición de la expresión del gen del huésped y se invirtió más rápidamente que la proteína M salvaje. Por tanto, en determinadas realizaciones, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende una o más mutaciones puntuales en su genoma.

4. Mutaciones no citopáticas en el gen m

En determinadas otras realizaciones, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende una mutación no citopática en el gen M. El gen M del VSV (serotipo Indiana) codifica una proteína M de 229 aminoácidos (matriz), en la que los primeros treinta aminoácidos en el extremo NH₂ comprenden un motivo PPPY rico en prolina (PY) (Harty y col., 1999). El motivo PY de la proteína M del VSV se localiza en las posiciones de aminoácidos 24 - 27 en los serotipos del VSV Indiana (número de acceso en Genbank X04452) y New Jersey (número de acceso en Genbank M14553). Jayakar y col., (2000) demostraron que las mutaciones en el motivo PY (por ejemplo APPY, AAPY, PPAY, APPA, AAPA y PPPA) reducen el rendimiento del virus bloqueando una etapa tardía en la gemación del virus. Por tanto, en determinadas realizaciones, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende una mutación no citopática en el gen M, en el que la mutación está en el motivo PPPY de la proteína M codificada.

Recientemente se ha notificado que el ARNm de M codifica además dos proteínas adicionales denominadas M2 y M3 (Jayakar y Whitt, 2002). Las proteínas M2 y M3 se sintetizan a partir de metioninas cadena abajo en el mismo marco de lectura que codifica la proteína M de 229 aminoácidos (denominada M1) y carecen de los primeros treinta y dos (proteína M2) o cincuenta (proteína M3) aminoácidos de la proteína M1. Se ha observado que las células infectadas con un VSV recombinante que expresa la proteína M, pero no M2 y M3, exhiben un inicio retardado del efecto citopático (en determinados tipos celulares), aunque producen un rendimiento de virus normal. Por tanto, en determinadas realizaciones, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende una mutación no citopática en el gen M, en e que la mutación en el gen M tiene como resultado un virus que no expresa la proteína M2 o M3 (por ejemplo, véase Jayakar y Whitt, 2002).

En el presente documento también se contemplan mutaciones de aminoácidos (por ejemplo, deleciones, sustituciones, inserciones etc.) en el motivo PSAP (PS) de la proteína M descrito por Irie y col., (2004).

5. Mutaciones en el arn ambisentido

En determinadas realizaciones, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende una mutación en el ARN ambisentido, en la que el promotor del antigenoma en 5' (AGP) está sustituido por una copia del promotor del genoma 3' (GP). El 5' AGP del VSV, así como otros virus de ARN de hebra negativa no segmentado, actúa como un fuerte promotor de la replicación, mientras que el 3' GP actúa como promotor de la transcripción y un débil promotor de la replicación. En la evolución normal de la infección del VSV, existe una predominancia por 3 o por 4 de las copias del genoma sobre las copias del antigenoma; esta proporción es incluso superior para el virus de la rabia, otro miembro de la familia de rhabdovirus (Finke y Conzelmann, 1999). En trabajos previos con el virus de la rabia se demostró que sustituyendo el 5' AGP por una copia del GP (conocido como una mutación en el ARN ambisentido) se producían niveles iguales de copias del ARN del genoma y del antigenoma en las células infectadas. Además, se expresó un gen extraño a partir de la copia del GP colocado en el extremo 5' del genoma. Cuando se pasa en serie en células cultivadas, el virus de la rabia que contiene la mutación en el ARN ambisentido se replicó de forma consistente a títulos 10 a 15 títulos menores que un virus de la rabia salvaje recombinante Finke y Conzelmann, 1997). Dicha mutación se usa en vectores del VSV para atenuar la replicación del virus y expresar genes extraños. Por tanto, en ciertas realizaciones, un VSV modificado genéticamente comprende una mutación en el ARN ambisentido.

6. Deleciones génicas

En otras realizaciones determinadas, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende un virus en el que un gen del VSV (tal como G o M) se deleciona del genoma. Por ejemplo, Roberts y col., (1999) describieron un

vector del VSV en el que la totalidad del gen que codifica la proteína G se deletionó (ΔG) y se sustituyó por la proteína hemaglutinina (HA) de la gripe, en el que el vector del VSV (ΔG -HA) demostraba una patogenicidad atenuada.

B. Vectores del virus de la estomatitis vesicular recombinante

5 En determinadas realizaciones, la invención proporciona un vector del VSV recombinante modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma y al menos una secuencia de ARN extraño insertada como una unidad transcripcional independiente insertada en o en sustitución de una región del genoma del VSV no esencial para la replicación.

10 Los procedimientos para producir el virus del ARN recombinante se denominan en la técnica procedimientos de "rescate" o "de genética inversa". Procedimientos de rescate de ejemplo para el VSV se describen en la patente de EE.UU. 6.033.886, la patente de EE.UU. 6.596.529 y el documento WO 2004/113517. La transcripción y la replicación de genomas virales de ARN de sentido negativo, monocatenarios no segmentados se producen mediante la actividad enzimática de un complejo proteico multimérico que actúa sobre el núcleo ribonucleoproteico (nucleocápside). El ARN genómico desnudo no puede servir como molde. En su lugar, estas secuencias genómicas solo se reconocen cuando están completamente encapsidadas por la proteína N en la estructura de la nucleocápside. Solo es en dicho contexto en que las secuencias promotoras terminales genómicas y antigénicas son reconocidas para iniciar las vías de transcripción o de replicación.

20 Un ADN clonado equivalente al genoma del VSV se introduce entre un promotor de la ARN polimerasa dependiente de ADN adecuado (por ejemplo, el promotor de la ARN polimerasa de T7) y una secuencia de ribozima de autoescisión (por ejemplo, la ribozima delta de la hepatitis), que se inserta en un vector de transcripción adecuado (por ejemplo, un plásmido bacteriano propagable). Este vector de transcripción proporciona el molde de ADN fácilmente manipulable a partir del cual la ARN polimerasa (por ejemplo, ARN polimerasa de T7) puede transcribir fielmente una copia de ARN monocatenario del antígeno (o genoma) del VSV con los extremos 5' y 3' precisos, o casi preciso. La orientación de la copia del ADN genómico del VSV y las secuencias promotor y de ribozima flanqueantes determinan si se transcriben los equivalentes de ARN del antígeno o del genoma. Asimismo, para el rescate de la nueva progenie del VSV son las proteínas de soporte de acción trans específicas del VSV necesarias para encapsidar los transcritos de ARN del antígeno o genoma del VSV monocatenarios desnudos en moldes de la nucleocápside funcionales: la proteína de la nucleocápside viral (N), la fosfoproteína asociada con la polimerasa (P) y la proteína polimerasa (L). Estas proteínas comprenden la ARN polimerasa dependiente de ARN viral activa que debe enganchar este molde de la nucleocápside para realizar la transcripción y la replicación.

30 Por tanto, un VSV modificado genéticamente atenuado de la invención, que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma (por ejemplo, véase la Sección A) se produce de acuerdo con los procedimientos de rescate conocidos en la técnica. Por ejemplo, un vector del VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma se genera usando (1) un vector de transcripción que comprende una molécula de ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un genoma o antígeno de un VSV y (2) al menos un vector de expresión que comprende al menos una molécula de ácido nucleico aislado que codifica las proteínas de acción en trans N, P y L necesarias para la encapsidación, transcripción y replicación; en una célula huésped en condiciones suficientes para permitir la coexpresión de estos vectores y la producción del VSV recombinante. Cualquier serotipo o cepa de VSV adecuados se puede usar de acuerdo con la presente invención, incluyendo, entre otras las cepas VSV Indiana, VSV New Jersey, VSV Chandipura, VSV Isfahan, VSV San Juan, VSV Glasgow y similares.

45 Además de las secuencias de polinucleótidos que codifican formas atenuadas del VSV, la secuencia de polinucleótidos también puede codificar una o más secuencias de polinucleótidos heterólogas (o extrañas) o marcos de lectura abiertos (ORF) (véase, por ejemplo, la Sección C). Las secuencias de polinucleótidos heterólogas pueden variarse según se desee e incluir, entre otros, un cofactor, una citocina (tal como una interleucina), un epítipo de linfocitos T colaboradores, un epítipo de CTL, un marcador de restricción, un adyuvante o una proteína o un patógeno microbiano diferente (por ejemplo, virus, bacteria, parásito u hongo), especialmente proteínas capaces de provocar respuestas inmunitarias deseables. En determinadas realizaciones, un ORF heterólogo contiene un gen del VIH (por ejemplo, *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* o *vpu*). En una realización particular, el gen del VIH es *gag*, en el que el gen *gag* se inserta en el genoma del VSV en la posición uno (3'-*gag*₁-NPMGL-5') o en la posición cinco (3'-NPMG-*gag*₅-L-5'). El polinucleótido heterólogo también se usa para proporcionar agentes que se usan para terapia génica. En otra realización, la secuencia de polinucleótidos heteróloga codifica además una citocina, tal como interleucina-12, que se seleccionan para mejorar las características profilácticas o terapéuticas del VSV recombinante.

55 En determinadas realizaciones, un VSV modificado genéticamente y atenuado de la invención se muta por medios convencionales, tales como mutagénesis química. Por ejemplo, durante el crecimiento del virus en los cultivos celulares se añade un mutágeno químico, seguido de: (a) selección del virus que se ha sometido al paso a una temperatura subóptima con el fin de seleccionar mutaciones sensibles a la temperatura y/o adaptadas al frío, (b) identificación de virus mutantes que producen placas pequeñas en cultivo celular y (c) paso a través de huéspedes heterólogos para seleccionar mutaciones en una serie de huéspedes. En otras realizaciones, las mutaciones atenuantes comprenden realizar mutaciones predeterminadas usando mutagénesis dirigida a sitio (por ejemplo,

60

véase la Sección A) y después rescatar los virus que contienen estas mutaciones. Como se ha expuesto en lo que antecede, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende al menos dos clases de mutaciones en su genoma. En determinadas realizaciones, una o más clases de mutación comprenden además múltiples mutaciones, tales como la clase de mutación en el tallo de G que tiene una mutación doble (por ejemplo, una delección, inserción, sustitución etc.), una mutación triple y similares. Estos vectores de VSV atenuados se someten a detección selectiva de la atenuación de su virulencia en un modelo animal (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1 y el Ejemplo 3).

Las circunstancias típicas (aunque no necesariamente excluyentes) para el rescate incluyen un medio celular de mamíferos adecuado en el que haya polimerasa de T7 para dirigir la transcripción del ARN monocatenario antígenómico (o genómico) del vector de transcripción que contiene el ADNc genómico viral. Al mismo tiempo que la transcripción, o poco después, este transcrito de ARN viral antígenómico (o genómico) está encapsidado en moldes funcionales por la proteína de la nucleocápside y enganchado por los componentes necesarios de la polimerasa producidos de forma concurrente a partir de plásmidos de expresión cotransfectados que codifican las proteínas de acción trans específicas de virus requeridas. Estos acontecimientos y procesos conducen a la transcripción prerrequisito de ARNm virales, la replicación y amplificación de nuevos genomas y de este modo, la producción de nueva progenie del VSV, es decir rescate.

El vector de transcripción y el vector de expresión normalmente son vectores plasmídicos diseñados para su expresión en la célula huésped. El vector de expresión que comprende al menos una molécula de ácido nucleico aislado que codifica las proteínas de acción trans necesarias para la encapsidación, la transcripción y la replicación expresa estas proteínas a partir del mismo vector de expresión o al menos dos vectores diferentes. Generalmente estos vectores se conocen a partir de procedimientos de rescate básicos y no tienen que alterarse para su uso en los procedimientos mejorados de la presente invención.

Las técnicas adicionales para realizar el rescate de virus tales como VSV se describen en la patente de EE.UU. 6.673.572 y la patente provisional de EE.UU. 60/477.389.

Las células huésped usadas en el rescate de VSV son aquellas que permiten la expresión de vectores de los constituyentes requeridos necesarios para la producción de VSV recombinante. Dichas células huésped se pueden seleccionar de una célula procariota o una célula eucariota y, preferentemente, una célula de vertebrado. En general, las células huésped derivan de una célula humana, tal como una célula renal embrionaria humana (por ejemplo, 293). Las células Vero, así como muchos otros tipos de células también se usan como células huésped. Los siguientes son ejemplos no limitantes de células huésped adecuadas: (1) líneas celulares primarias diploides humanas (por ejemplo, células WI-38 y MRC5); (2) línea celular diploide de mono (por ejemplo, células de pulmón de rhesus fetal FRhL); (3) línea celular continua casi primaria (por ejemplo, células de riñón de mono verde africano AGMK); (4) células 293 humanas y (5) otras potenciales líneas celulares, tales como CHO, MDCK (riñón canino de Madin-Darby), fibroblastos de embrión de pollo primarios. En determinadas realizaciones se añade un reactivo para facilitar la transfección con el fin de aumentar la captación de ADN por las células. Muchos de estos reactivos son conocidos en la técnica (por ejemplo, fosfato de calcio). Lipofectace (Life Technologies, Gaithersburg, MD) y Effectene (Qiagen, Valencia, CA) son ejemplos habituales. Lipofectace y Effectene son ambos lípidos catiónicos. Ambos recubren el ADN y potencian la captación de ADN por las células. Lipofectace forma un liposoma que rodea al ADN, mientras que Effectene recubre el ADN, pero no forma un liposoma.

El VSV atenuado rescatado se analiza después para determinar su fenotipo deseado (sensibilidad a la temperatura, adaptación al frío, morfología de la placa y atenuación de la transcripción y la replicación), primero por medios *in vitro*. Las mutaciones también se analizan utilizando un sistema de minirreplicación en el que las actividades de encapsidación y de polimerasa que actúan en trans necesarias son proporcionadas por los virus salvajes o adyuvantes de vacunas, o por plásmidos que expresan los diferentes genes N, P y L que albergan mutaciones atenuantes específicos de los genes. El VSV atenuado también se analiza *in vivo* para determinar la atenuación sinérgica en un modelo de neurovirulencia animal. Por ejemplo, se establecen modelos de ratón y / o de hurón para la detección de la neurovirulencia. En resumen, a grupos de diez ratones se inyecta por vía intracraneal (IC) cada uno de una gama de concentraciones de virus que abarcan la dosis DL_{50} prevista (una dosis que es letal para el 50 % de los animales). Por ejemplo, se usan inoculaciones IC con el virus a 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 ufp en las que la DL_{50} prevista para el virus está en el intervalo de 10^3 - 10^4 ufp. Las formulaciones de virus se preparan mediante dilución en serie de reservas de virus purificado en PBS. Después se inyecta a los ratones a través de la parte superior del cráneo con la dosis requerida, en 50-100 μ l de PBS. Se vigila a los animales diariamente para detectar pérdida de peso, la morbilidad y la muerte. El DL_{50} para un vector de virus se calcula después a partir de la muerte acumulada de los ratones en el intervalo de concentraciones analizadas.

C. Secuencias y antígenos de ácido nucleico heterólogo

En determinadas realizaciones, la invención proporciona VSV sinérgicamente atenuada que comprende además una secuencia de ARN extraño como una unidad transcripcional independiente insertada en o en sustitución de un sitio del genoma no esencial para la replicación, en el que la secuencia de ARN extraño (que está en el sentido negativo) dirige la producción de una proteína capaz de expresarse en una célula huésped infectada por VSV. Este genoma recombinante se produce originalmente mediante inserción de ADN extraño que codifica la proteína en el ADNc del VSV. En determinadas realizaciones, cualquier secuencia de ADN que codifica un antígeno inmunogénico, que

produce inmunidad profiláctica o terapéutica contra una enfermedad o trastorno, cuando se expresa como una proteína de fusión o de no fusión en un VSV recombinante atenuado sinérgicamente de la invención, solo o en combinación con otros antígenos expresados por el mismo VSV o uno diferente, se aísla y se incorpora en el vector de VSV para su uso en las composiciones inmunogénicas de la presente invención.

- 5 En determinadas realizaciones, la expresión de un antígeno por un VSV recombinante atenuado sinérgicamente induce una respuesta inmunitaria contra un microorganismo patógeno. Por ejemplo, un antígeno puede mostrar la inmunogenicidad o antigenicidad de un antígeno encontrado en bacterias, parásitos, virus u hongos que son agentes causantes de enfermedades o trastornos. En una realización se usan antígenos que presentan la antigenicidad o la inmunogenicidad de un antígeno de un patógeno humano u otros antígenos de interés.
- 10 Para determinar la inmunogenicidad o antigenicidad detectando la unión a anticuerpos se utilizan diversos inmunoensayos conocidos en la técnica, incluyendo, entre otros, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos inmunorradiométricos, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (usando oro coloidal, enzima o marcadores radioisótopos, por ejemplo), transferencias de tipo Western, reacciones de inmunoprecipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación al complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunolectroforesis, ensayos de neutralización, etc. En una realización, la unión al anticuerpo se mide mediante la detección de un marcador en el anticuerpo primario. En otra realización, el anticuerpo primario se detecta midiendo la unión de un anticuerpo secundario o reactivo frente al anticuerpo primario. En una forma de realización adicional, el anticuerpo secundario está marcado: En la técnica se conocen muchos medios para detectar la unión en un inmunoensayo. En una realización para detectar la inmunogenicidad, las respuestas mediadas por linfocitos T se analizan mediante procedimientos estándar, por ejemplo, ensayos de citotoxicidad *in vitro* o *in vivo*, ensayos de tetrámeros, ensayos de ELISPOT o ensayos de hipersensibilidad retardada *in vivo*.
- 20
- 25 Los parásitos y bacterias que expresan epítopos (determinantes antigénicos) que son expresados por VSV sinérgicamente atenuado (en el que el ARN extraño dirige la producción de un antígeno del parásito o bacteria o un derivado del mismo que contiene un epítipo del mismo) incluyen, entre otros, los enumerados en el Tabla 1.

TABLA 1

PARÁSITOS Y BACTERIAS QUE EXPRESAN EPÍTOPOS QUE PUEDEN EXPRESAR EL VSV
PARÁSITOS
Plasmodium spp.
Eimeria spp.
Nematodos
Esquistosomas
Leishmania
BACTERIAS
<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Corynebacteria diphtheriae</i>
<i>Clostridium tetani</i>
<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Haemophilus</i> spp. (por ejemplo, <i>influenzae</i>)
<i>Chlamydia</i> spp.
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
<i>Helicobacter pylori</i>
Micobacterias

5 En otra realización, el antígeno comprende un epítipo de un antígeno de un nematodo, para proteger contra trastornos provocados por tales gusanos. En otra realización, cualquier secuencia de ADN que codifica un epítipo de Plasmodium, que cuando se expresa por un VSV recombinante, es inmunogénico en un huésped vertebrado, se aísla para la inserción en el ADN (-) del VSV de acuerdo con la presente invención. Las especies de Plasmodium que sirven como fuentes de ADN incluyen, entre otros, los parásitos del paludismo humano *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. viva*, y los parásitos del paludismo animal *P. berghei*, *P. yoelii*, *P. knowlesi* y *P. cynomolgi*. En otra realización más, el antígeno comprende un péptido de la subunidad β de la toxina del cólera.

10 Los virus que expresan epítipos que son expresados por el VSV atenuado sinérgicamente (en el que el ARN extraño dirige la producción de un antígeno del virus o un derivado del mismo que comprende un epítipo del mismo) incluyen, entre otros, los enumerados en la Tabla 2, que enumera tales virus por familia para fines de limitación de comodidad y no de limitación.

TABLA 2

VIRUS QUE EXPRESAN EPÍTOPOS QUE PUEDEN SER EXPRESADOS POR EL VSV
I. Picornaviridae
Enterovirus
Poliovirus
Virus Coxsackie
Echovirus
Rhinovirus
Virus de la hepatitis A
II. Calciviridae
Grupo de virus de Norwalk
III. Togaviridae y Flaviviridae
Togavirus (por ejemplo el virus del Dengue)
Alfavirus
Flavivirus (p. ej., virus de la hepatitis C)
Virus de la rubéola
IV. Coronaviridae
Coronavirus
V. Rhabdoviridae
Virus de la rabia
VI. Filoviridae
Virus de Marburg
Virus ébola
VII. Paramyxoviridae
Virus de parainfluenza
Virus de la parotiditis
Virus del sarampión
Virus sincitial respiratorio
Metapneumovirus
VIII. Orthomyxoviridae
Ortomixoviruses (por ejemplo el virus de la gripe)
IX. Bunyaviridae
Bunyavirus

VIRUS QUE EXPRESAN EPÍTOPOS QUE PUEDEN SER EXPRESADOS POR EL VSV
X. Arenaviridae
Arenavirus
XI. Reoviridae
Reovirus
Rotavirus
Orbivirus
XII. Retroviridae
Virus de tipo I de la leucemia de linfocitos T humanos
Virus de tipo II de la leucemia de linfocitos T humanos
Virus de la inmunodeficiencia humana (por ejemplo de tipo I y de tipo II)
Virus de la inmunodeficiencia en simios
Lentivirus
XIII. Papoviridae
Poliomavirus
Papilomavirus
XIV. Parvoviridae
Parvovirus
XV. Herpesviridae
Virus del herpes simple
Virus de Epstein-Barr
Citomegalovirus
Virus de varicela zóster
Herpesvirus 6 humano
Herpesvirus 7 humano
Herpesvirus 1 de cercopitecina (virus B)
XVI. Poxviridae
Poxvirus
XVIII. Hepadnaviridae
Virus de la hepatitis B
XIX. Adenoviridae

5 En realizaciones específicas, el antígeno codificado por las secuencias extrañas que se expresa tras la infección de un huésped por el VSV atenuado presenta la antigenicidad o inmunogenicidad de una hemaglutinina del virus de la gripe; la glicoproteína G (G) del virus sincitial respiratorio humano; la glicoproteína gD de tipo 2 del virus del herpes simples o la hemaglutinina del virus del sarampión.

Otros antígenos que son expresados por el VSV atenuado incluyen, entre otros, los que presentan la antigenicidad o inmunogenicidad de los siguientes antígenos: VP1 del poliovirus 1; glicoproteínas de la cubierta del VIH 1; antígeno de superficie de la hepatitis B; toxina diftérica; epítipo 24M de *Streptococcus SpeA*, *SpeB*, *SpeC* o *C5a* peptidasa; y pilina gonocócica.

10 En otras realizaciones, el antígeno expresado por el VSV atenuado presenta la antigenicidad o inmunogenicidad de g50 del virus de (gpD), virus de la pseudorrabia II (GPB), virus de la pseudorrabia gIII (GPC), glicoproteína H del virus de la pseudorrabia, glicoproteína E del virus de la pseudorrabia, glicoproteína 195 del virus de la gastroenteritis transmisible, proteína de la matriz el virus de la gastroenteritis transmisible, glicoproteína 38 del rotavirus porcino, proteína de la cápside del parvovirus porcino, antígeno protector de *Serpulina hydodysenteriae*, glicoproteína 55 de

la diarrea bovina viral, hemaglutinina-neuraminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle, hemaglutinina de la gripe porcina, o neuraminidasa de la gripe porcina.

5 En determinadas realizaciones, un antígeno expresado por el VSV atenuado presenta la antigenicidad o inmunogenicidad de un antígeno derivado de un patógeno canino o felino, incluyendo, entre otros, el virus de la leucemia felina, el virus del moquillo canino, adenovirus canino, parvovirus canino y similares.

10 En determinadas otras realizaciones, el antígeno expresado por el VSV atenuada presenta la antigenicidad o inmunogenicidad de un antígeno derivado de *Serpulina hyodysenteriae*, el virus de la enfermedad de pie y boca, el virus del cólera Hog, el virus de la gripe porcina, el virus de la fiebre porcina africana, *Mycoplasma hyopneumoniae*, el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (por ejemplo, la glicoproteína E o la glicoproteína G del virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa) o el virus de la laringotraqueítis infecciosa (por ejemplo, la glicoproteína G o la glicoproteína I del virus de la laringotraqueítis infecciosa).

En otra realización, el antígeno presenta la antigenicidad o inmunogenicidad de una glicoproteína del virus de La Crosse, el virus de la diarrea de ternera neonata, el virus de la encefalomiелitis equina venezolana, el virus Punta Toro, el virus de la leucemia murina o el virus del tumor mamario de ratón.

15 En otras realizaciones, el antígeno presenta la antigenicidad o inmunogenicidad de un antígeno de un patógeno humano, incluyendo, entre otros, el herpesvirus humano, el virus del herpes simple 1, el virus del herpes simple 2, el citomegalovirus humano, el virus de Epstein-Barr, el virus de la varicela zóster, el herpesvirus 6 humano, el herpesvirus 7 humano, el virus de la gripe humana, el virus de la inmunodeficiencia humana (de tipo 1 y / o tipo 2), el virus de la rabia, el virus del sarampión, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, *Plasmodium falciparum* y *Bordetella pertussis*.

20 Antígenos o derivados de los mismos potencialmente útiles para su uso como antígenos expresados por el VSV atenuado se identifican mediante varios criterios, tales como la participación del antígeno en la neutralización de la infectividad, tipo o grupo especificidad de grupo de un patógeno, el reconocimiento por antisueros o células inmunitarias de los pacientes y / o la demostración de efectos protectores de antisueros o células inmunitarias específicas para el antígeno.

30 En otra realización, el ARN extraño del VSV atenuado dirige la producción de un antígeno que comprende un epítipo, que cuando el VSV atenuado se introduce en un huésped deseado, induce una respuesta inmunitaria que protege contra una afección o trastorno provocado por una entidad que contiene el epítipo. Por ejemplo, el antígeno puede ser un antígeno específico de tumor o un antígeno asociado a tumor, para la inducción de una respuesta inmunológica protectora contra un tumor (por ejemplo, un tumor maligno). Dichos antígenos específicos de tumores o asociados a tumores incluyen, entre otros, el antígeno de pancarcinoma KS 1/4; el antígeno de carcinoma de ovarios (CA125); fosfato ácido prostático; el antígeno específico de la próstata; el antígeno p97 asociado al melanoma; el antígeno gp75 del melanoma; el antígeno de melanoma de alto peso molecular y el antígeno de membrana específico de la próstata.

35 El ADN extraño que codifica el antígeno que se inserta en un sitio no esencial del ADN del VSV atenuado, opcionalmente comprende además una secuencia de ADN extraño que codifica una citocina capaz de expresarse y estimular una respuesta inmunitaria en un huésped infectado por el VSV atenuado. Por ejemplo, dichas citocinas incluyen, entre otras, las interleucinas 1 α , 1 β , 2, 4, 5,6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18, el interferón- α , el interferón- β , el interferón- γ , el factor estimulante de las colonias de granulocitos, el factor estimulante de las colonias de granulocitos macrófagos y el factor de necrosis tumoral α y β .

D. Composiciones inmunogénicas y farmacéuticas

45 En determinadas realizaciones, la invención está dirigida a una composición inmunogénica que comprende una dosis inmunogénica de un vector del VSV modificado genéticamente que comprende al menos dos clases diferentes de mutaciones en su genoma y al menos una secuencia de ARN extraño insertada en o en sustitución de una región del genoma del VSV no esencial para la replicación, en el que las dos mutaciones atenúan sinérgicamente la patogenicidad del VSV.

50 Los vectores del VSV atenuados de forma sinérgica de la invención se formulan para la administración a un sujeto mamífero (por ejemplo, un ser humano). Dichas composiciones normalmente comprenden el vector del VSV y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa a continuación en el presente documento, se pretende que "transportador farmacéuticamente aceptable" incluya todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto cuando alguno de los medios o agentes convencional sea incompatible con el vector del VSV, dichos medios se usan en las composiciones inmunogénicas de la invención. En las composiciones también pueden incorporarse compuestos activos suplementarios.

Una composición inmunogénica del VSV de la invención se formula para que sea compatible con su vía de administración destinada. Ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral (por ejemplo

intravenosa, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal) y mucosa (por ejemplo, oral, rectal, intranasal, bucal, vaginal, respiratoria). Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea incluyen los componentes siguientes: un diluyente estéril tal como agua para inyectables, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenes; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetracético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se ajusta con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral se puede introducir en ampollas, jeringuillas desechables o viales multidosis de vidrio o de plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles (cuando sean hidrosolubles) y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los transportadores adecuados incluyen solución fisiológica salina, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida de modo que se pueda introducir con facilidad en las jeringuillas. Debe ser estable en las condiciones de la fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo es un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se mantiene, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se consigue mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenes, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y similares. En muchos casos es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se efectúa incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan mediante la incorporación del vector del VSV en la cantidad (o dosis) requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de ingredientes enumerados en lo que antecede, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados en lo que antecede. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son secado al vacío y liofilización, que da un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución del mismo previamente filtrada para esterilizar.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos se liberan en forma de un pulverizador en aerosol a partir de un recipiente o dispensado presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. La administración sistémica también puede ser por vía mucosa o transdérmica. Para la administración mucosa o transdérmica, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera que se va a permear. En general, estos penetrantes se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración mucosa, detergentes, sales de bilis y derivados de ácido fusídico. La administración mucosa se consigue mediante el uso de pulverizadores nasales o supositorios. Los compuestos también se preparan en forma de supositorios (p. ej., con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para liberación rectal.

En determinadas realizaciones es ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en lo sucesivo en el presente documento se refiere a unidades físicamente pequeñas adaptadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la invención viene dictada y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico concreto que se debe conseguir y de las limitaciones inherentes en la técnica de formar tal compuesto activo para el tratamiento de individuos.

D. Ejemplos

Los ejemplos siguientes se llevan a cabo usando técnicas estándar, que son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la técnica, excepto donde se describa lo contrario en detalle. Los siguientes ejemplos se presentan con fines ilustrativos y no deben interpretarse de ningún modo como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos

Mutantes de la cola citoplasmática de la proteína G del VSV

Los procedimientos usados para la generación de mutantes de la cola citoplasmática de la proteína G de la presente invención se conocen en la técnica y son descritos con detalle por Schnell y col., (1998). Estos mutantes de la proteína G retenían un único aminoácido ($G_{(ct-1)}$) o nueve aminoácidos ($G_{(ct-9)}$) en el dominio de la cola citoplasmática G en comparación con el dominio de la cola citoplasmática de veintinueve aminoácidos de la cepa Indiana del VSV salvaje (SEC ID N° 1). Se generaron truncamientos de la cola citoplasmática desplazando el codón de terminación 60 nucleótidos u 84 nucleótidos (es decir, la cola citoplasmática de nueve aminoácidos y la cola citoplasmática de un aminoácido, respectivamente) en dirección 5' del auténtico codón de terminación y tiene como resultado el truncamiento de la proteína G.

Mutantes por barajado del gen N del VSV

10 Se generaron mutantes por translocación del gen N (barajados de N) recolocando el gen N como segundo, tercer o cuarto gen desde el extremo 3' del genoma del virus. Por ejemplo, el orden auténtico del gen para el VSV salvaje, 3'-NPMGL-5', se mutó a 3'-PNMGL-5' y 3'-PMNGL-5'. La translocación del gen N más adelante desde el promotor de la transcripción 3'ARN produce un descenso proporcionado del nivel de expresión del gen N (por ejemplo, véase la patente de EE.UU. 6.596.529). Una reducción del nivel de la proteína N en células infectadas ralentiza la formación de la nucleocápside viral de modo que, en última instancia, se reduce el índice de replicación del genoma y la formación de partículas víricas. Los procedimientos usados par alas translocaciones del gen N se describen a continuación.

20 Para la primera etapa en la producción de los barajados del gen N, el gen N se cortó completamente del ADNc del genoma del virus de longitud completa, con el resultado de que el gen P quedó inmediatamente adyacente al líder del virus, en lugar del gen N. Para eliminar el gen N se realizaron dos productos de PCR con un ADNc del genoma de longitud completa como molde. El primer producto de la PCR contenía la secuencia que abarca desde un sitio BsaAI natural en 5' del promotor de T7 hasta el final de la secuencia líder del virus y un sitio BsmBI en 3' añadido. El segundo producto de la PCR contenía la secuencia que abarca desde el sitio XbaI natural en el gen P a la señal de iniciación de la transcripción para el gen P, adyacente a un sitio BsmBI en 5' añadido. Los sitios BsmBI se dispusieron de un modo que ambos productos de PCR podrían unirse sin costuras (tras la digestión y empalme), para dar un único fragmento de ADN que contenía la secuencia líder del virus inmediatamente adyacente al gen P. Este fragmento de ADN se empalmó después en los sitios XbaI/BsaAI del ADNc del genoma de longitud completa de modo que se elimina eficazmente el gen N del genoma del virus.

30 En la siguiente etapa de la generación de los barajados del gen N, el gen N se insertó entre los genes P y M o los genes M y G o los genes G y L del ADNc del genoma N delecionado. Para la inserción del gen N entre los genes P y M se prepararon tres productos de PCR con el ADNc del genoma de longitud completa como molde. El primer producto de la PCR contenía la secuencia que abarca desde el sitio XbaI natural en el gen P a la señal de iniciación de la transcripción del gen M con un sitio BsmBI flanqueante añadido. El segundo producto de la PCR contenía la secuencia que abarca desde la señal de iniciación de la transcripción del gen N a la secuencia TATG conservada adyacente a la señal de poliadenilación 3' -AAAAAAA- en el gen N con un sitio BsmBI flanqueante añadido. El tercer producto de la PCR contenía la secuencia que abarca desde el sitio MluI natural al comienzo del gen G a la señal de poliadenilación TATGAAAAAAA conservada del gen P con un sitio BsmBI flanqueante añadido. Los tres fragmentos se digirieron después con BsmBI y se volvieron a empalmar para formar un único fragmento de ADN con el gen N flanqueado por parte del gen P y el gen M. Este fragmento de ADN se digirió después con XbaI y MluI y se empalmó en los sitios XbaI/ MluI del genoma del virus delta-N para formar el ADNc 3'-PNMGL-5'.

45 Para generar el ADNc del genoma 3'-PMNGL-5' se prepararon dos productos de PCR independientes. El primer producto de la PCR contenía la secuencia que abarca desde el sitio XbaI natural en el gen P a la señal de iniciación de la transcripción (5'-AACAG-3') del gen G con un sitio BsmBI flanqueante añadido. El segundo producto de PCR contenía la totalidad de la secuencia del gen N a partir de la señal de iniciación de la transcripción con un sitio BsmBI en 5' flanqueante añadido hasta la señal de poliadenilación/terminación de la transcripción del gen N, con una secuencia flanqueante que abarca desde la señal de iniciación de la transcripción de G al sitio MluI natural en el gen G. La secuencia específica del gen G se añadió a la secuencia del gen N como parte del uno de los cebadores de la PCR. Ambos productos de la PCR se digirieron con BsmBI y se empalmaron para formar un único fragmento de ADN, que después se digirió con XbaI y MluI y se empalmó en los sitios XbaI/MluI del ADNc del genoma de N delecionado, para dar una disposición del gen 5'-PMNGL-3'.

55 Para generar el ADNc del genoma 5'-PMGNL-5', se prepararon tres productos de la PCR a partir de un molde de ADNc del genoma completo. El primer producto de la PCR contenía la secuencia que abarca desde el sitio Swal natural en el gen G a la señal de iniciación de la transcripción para el gen L, flanqueado por un sitio BsmBI añadido. El segundo producto de la PCR contenía la secuencia para la totalidad del gen N, desde la señal de iniciación de la transcripción a la señal de terminación de la transcripción, flanqueado en ambos extremos por sitios BsmBI añadidos. El tercer producto de la PCR contenía la secuencia que abarca desde la iniciación de la transcripción del gen L, flanqueado por un sitio BsmBI añadido, a un sitio HpaI natural en el gen L. Los tres productos de la PCR se digirieron con BsmBI y se empalmaron para formar un único fragmento de ADN, que después se digirió con Swal y HpaI y se empalmó en los sitios Swal/HpaI del ADNc del genoma de N delecionado, para dar una disposición del gen 5'-PMGNL-3'. En los tres genomas reordenados, la integridad de la secuencia de cada gen y las secuencias reguladoras flanqueantes eran idénticas a las del virus no alterado; solo la posición del gen N era diferente.

Combinación de mutaciones de la cola citoplasmática de la proteína G y mutaciones por barajado de N

La combinación de los barajados del gen N y los truncamientos de la cola citoplasmática de la proteína G tuvieron como resultado genomas doblemente mutados (es decir, dos clases de mutación), por ejemplo 3'-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-PNMG_(ct-1)L-5', y 3'-PMNG_(ct-9)L-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-5'. Los ADNc del genoma mutante doble se construyeron mediante intercambio del gen G natural en los genomas con N barajado, con los genes truncados G_(ct-1) o G_(ct-9) descritos en lo que antecede. El intercambio se realizó mediante digestión de los ADNc donantes (5'-NPM G_(ct-1)L-3' y 5'-NPM G_(ct-9)L-3') con MluI y HpaI, seguido de empalme de los genes G truncados purificados en los sitios MluI/HpaI de los genomas de ADNc con N barajado. Estos dobles mutantes se rescataron del ADNc, purificado con triple placa, amplificado y caracterizado en el cultivo celular mediante el tamaño de la placa y la cinética de crecimiento como se describe más adelante.

Mutaciones no citopáticas en el gen M

El gen M del VSV codifica la proteína de la matriz (M) del virus y dos polipéptidos dentro del marco más pequeños (M2 y M3). Los polipéptidos M2 y M3 se traducen a partir del mismo marco de lectura abierto (ORF) como la proteína M y carecen de los primeros 33 y 51 aminoácidos respectivamente. Un vector del VSV recombinante que comprende mutaciones no citopáticas del gen M (es decir, vectores del VSV que tampoco expresan las proteínas M2 y M3) se generó como se describe a continuación y que comprende además una o más mutaciones adicionales, de modo que se produce un vector del VSV altamente atenuado en cultivo celular y en animales.

Las mutaciones no citopáticas del gen M (M_(ncp)), que tienen como resultado la conversión de las metioninas 33 y 51 en alaninas (M33A, M51A) se generaron usando una estrategia de clonación basada en PCR, en la que se incorporaron las necesarias sustituciones de nucleótidos (AUG a GCT) en los cebadores para PCR (Jayakar y Whitt, 2002; Jayakar y col., 2000). Los productos resultantes de la PCR que contenían las mutaciones M33,51A se clonaron después en el genoma del ADNc del VSV de longitud completa, lo que permite el rescate del virus que no expresa los polipéptidos M2 y M3.

Las mutaciones M33,51A presentes en el ADNc del vector de VSV recombinante diseñado por Jayakar y Whitt se transfirieron al ADNc del o los vectores del VSV mediante intercambio del fragmento XbaI-MluI (que abarca la totalidad del gen M y parte del gen P). El intercambio del fragmento de ADNc no tuvo como resultado ningún cambio de codificación de aminoácidos sobre y por encima de las mutaciones M33,51^a.

Combinación de mutaciones de la cola citoplasmática de la proteína G y mutaciones no citopáticas del gen M

La combinación de ambos truncamientos de la cola citoplasmática de la proteína G y las mutaciones no citopáticas del gen M tuvo como resultado genomas doblemente mutados (es decir, dos clases de mutación), por ejemplo 3'-NPMncpGct-1 L-5' o 3'-NPMncpGct-9L-5'. Los ADNc del genoma doble mutante se construyeron mediante intercambio del ADNc del gen M que contiene las mutaciones que dan lugar al fenotipo no citopático, en el ADNc del genoma de longitud completa que contenía las mutaciones G_(ct-1) o G_(ct-9). En cada caso, el fragmento de ADNc intercambiado abarcaba desde el sitio único Xba I en el gen P al sitio único Mlu I en la región no traducida en 5' del gen G e incluía la totalidad de la secuencia no citopática del gen M.

Como se ha descrito anteriormente, la proteína M no citopática difería de la proteína M que reemplazó en solo dos sustituciones de aminoácidos (M33A y M51A), que dan lugar al fenotipo no citopático. Estos genomas doblemente mutados se modificaron adicionalmente mediante inserción del gen gag del VIH-1 en la posición 5 en el genoma, entre los genes G y L, para permitir la expresión de la proteína gag para estudios de inmunogenicidad. Como para otros vectores del virus VSVr, el gen gag se clonó en los sitios únicos Xho I/Nhe I en la posición 5 del ADNc del genoma.

Mutaciones sensibles a la temperatura del gen N del VSV y/o mutaciones sensibles a la temperatura del gen L del VSV

Un VSV recombinante (VSVr) que codifica la proteína Gag del VIH desde el primer cistron en 3' en el genoma viral (rVSV-Gag₁) se modificó sustituyendo el gen N y/o el gen L con secuencias de codificación homólogas derivadas de mutantes sensibles a la temperatura (ts) del VSV derivadas biológicamente (Pringle, 1970). Los vectores resultantes, (i) rVSV-Gag₁tsN (es decir, 3'-gag₁-N_(ts)PMGL-5') contenía el gen N ts de la cepa del VSV st41, (ii) rVSV-Gag₁tsL (es decir, 3'-gag₁-NPMGL_(ts)-5') contenía el gen L de la cepa del VSV st11 y (iii) rVSV-Gag₁tsN+L (es decir, 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5') contenía tanto el gen ts N de la cepa del VSV ST41 como el gen L de la cepa del VSV st11. Las cepas st41 y st11 del VSV también se conocen en la técnica como stG41 y stG11, respectivamente.

Pringle aisló ambas cepas donantes de gen ts derivadas biológicamente (Pringle, 1970) después de someter al VSV adaptado en laboratorio (la cepa Glasgow del serotipo Indiana) a mutagénesis química. Pringle también mapeó las mutaciones ts hasta el gen N o L.

Los genes st41 N y st11 L se clonaron a partir de ARN de células infectadas. En resumen, las células BHK se infectaron con st11 o st41 a una temperatura permisiva (31 - 32 °C). Se dejó que la infección procediera hasta que fue evidente un efecto citopático en más del 75 % de la monocapa celular, tiempo tras el cual se extrajo el ARN total y se purificó. Después, el ARN se sometió a transcripción inversa usando cebadores específicos del gen para dirigir

la síntesis de ADNc, tras lo cual el ADNc se amplificó mediante PCR. A continuación, los ADNc amplificados se clonaron en el ADNc genómico del vector de VSVr y se verificaron mediante análisis de secuencia.

5 La secuencia genómica completa de st11 y st41 y su cepa progenitora (Glasgow) se determinó para identificar los cambios de codificación que contribuyen al fenotipo ts. Comparando las secuencias de codificación del fondo del vector de VSVr, los mutantes ts de Pringue, y el virus progenitor de Glasgow, es posible predecir qué cambios de codificación contribuyen a los fenotipos ts de los vectores rVSV-Gag₁tsN, rVSV-Gag₁tsL y rVSV-Gag₁tsN+L.

10 La tabla 3 es una comparación de las secuencias de aminoácidos de la proteína N. Es evidente a partir de los datos que la sustitución del gen N del vector del VSVr por el homólogo st41 tenía como resultado sustituciones de 4 aminoácidos. Cualquiera de estos cambios puede afectar a la función de la proteína N en el contexto del fondo genético del vector y contribuye al fenotipo ts. Era destacable que solo un cambio (Tyr a Cys en la posición 74, los residuos se muestran en cursiva) distinguía st41 de su virus progenitor (Glasgow), lo que sugiere que esta sustitución puede ser un determinante de ts crucial.

TABLA 3

COMPARACIÓN DE LAS PROTEÍNAS N DEL VSV			
Nº de aminoácido	Cepa del virus		
	XN2	st41	Glasgow
14	Val	Ile	Ile
74	Tyr	Cys	Tyr
128	Ser	Arg	Arg
353	Asn	Ser	Ser

15 De un modo similar, la Tabla 4 proporciona la comparación de la proteína L. La sustitución del gen L en el vector del VSVr con el homólogo st11 tuvo como resultado cambios de codificación de 13 aminoácidos. Como se ha mencionado anteriormente para el gen N, cualquiera de estos cambios de codificación puede contribuir al fenotipo ts observado producido por la sustitución del gen L, pero varias de estas mutaciones de codificación (mostradas en cursiva) son de mayor interés porque también diferencia st11 de su virus progenitor de Glasgow, de modo que se
20 identifica potencialmente estas sustituciones de aminoácidos como contribuyentes cruciales al fenotipo ts.

TABLA 4

COMPARACIÓN DE LA PROTEÍNA L DEL VSV			
Nº de aminoácido	Cepa del virus		
	XN2	st11	Glasgow
87	Pro	<i>Ser</i>	<i>Ser</i>
88	Thr	<i>Ala</i>	<i>Thr</i>
202	Ile	Leu	Leu
203	Arg	Lys	Lys
268	Tyr	<i>His</i>	<i>Tyr</i>
367	Thr	Ala	Ala
1112	Pro	<i>Ser</i>	<i>Pro</i>
1374	Ala	Val	Val
1519	Ile	Leu	Leu
1792	Leu	Val	Val
1793	Ile	<i>Val</i>	<i>Ile</i>
2042	Leu	<i>Ser</i>	<i>Leu</i>
2075	Arg	Lys	Lys

En determinadas realizaciones, un VSV modificado genéticamente de la invención comprende una mutación en el gen G, en el que la proteína G codificada tiene una mutación en la región del tallo proximal de la membrana del ectodominio de la proteína G, denominada proteína tallo G. La mutación en el tallo H se introdujo sustituyendo el gen G en el fondo genético del vector VSV XN (Schnell y col., 1996) por un gen G modificado que codifica el tallo G. El tallo G (Robison, 2000) está compuesto por 108 de 512 aminoácidos de la proteína G, incluyendo: 1) los primeros 17 aminoácidos de la proteína G, que abarca la secuencia señal dirigida al polipéptido para la inserción en la membrana; 2) 42 aminoácidos del dominio extracelular proximal a la membrana denominado el tallo; 3) el dominio de 20 aminoácidos que atraviesa la membrana; y 4) la cola intracelular de 29 aminoácidos en el extremo carboxi. Esta configuración del polipéptido del tallo G contiene suficiente secuencia de la proteína G para participar en la maduración de las partículas virales, pero carece de las secuencias necesarias para actuar como proteína de unión celular. En consecuencia, las células infectadas con un vector del tallo G expresarán proteínas virales y el antígeno extraño codificado, pero producirán partículas virales descendientes que no son infecciosas porque el vector del tallo G no codifica una proteína G de función completa.

Para producir las partículas del vector del tallo G que contienen la proteína G funcional necesarias para infectar una célula diana, la proteína G de longitud completa debe proporcionarse en *trans*. Esto se puede lograr durante el rescate del virus y la posterior producción de vacunas mediante uno de varios procedimientos: 1) se pueden desarrollar líneas celulares que expresan la proteína G; 2) se puede usar un vector viral complementario que expresa la proteína G, tal como adenovirus, MVA o VEE; o 3) las células usadas para la producción se pueden transfectar con un vector de ADN plasmídico o ARNm que codifica la proteína G.

En la actualidad, el vector del tallo G se produce mediante complementación transitoria en células transfectadas con un plásmido diseñado para expresar la proteína G. Esto evita la necesidad de generar líneas celulares que expresan la proteína G, que son difíciles de producir porque la proteína G es tóxica y también evita la introducción de un reactivo biológico como un virus colaborador en el procedimiento de producción. En algunas configuraciones del vector del tallo G, los cistrones que codifican proteínas virales se han barajado en dirección 3' para permitir la inserción de un gen extraño en la primera posición en el genoma. Esto atenúa el virus y coloca el gen del antígeno extraño proximal al promotor, lo que asegura niveles de expresión altos.

Como se ha descrito anteriormente en la Sección A1, la inserción del gen *gag* del VIH (o de cualquier otro gen) en el genoma del VSV en la posición 1 (3'-*gag*₁-NPMGL-5') tiene como resultado eficaz una mutación por barajado génico, en la que se mueven los genes N, P, M, G y L desde sus posiciones salvajes a posiciones más distales en el genoma. Por tanto, la combinación de la mutación G_(tallos) y la inserción de *gag* en el genoma del VSV en la posición 1 (*gag*₁) produjo un genoma doblemente mutado 3'-*gag*₁-NPMG_(tallos)L-5'.

Rescate de virus de la estomatitis vesicular en células 293

El rescate satisfactorio del VSV de células 293 se consiguió usando el sistema básico de shock térmico/plásmido-T7 descrito en la solicitud internacional WO 2004/113517 de acuerdo con el siguiente protocolo revisado.

35 Materiales

ADN plasmídicos: 1) ADNc genómico viral de longitud completa, 2) pT7-N, 3) pT7-P, 4) pT7-L, 5) pT7-M, 6) pT7-G y 7) pCI-Neo-bcl-T7 (p0061).

40 Reactivos de transfección de calcio-fosfato: 1) 2X solución salina tamponada con BES: BES 50 mM (pH 6,95 - 6,98), NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, 2) CaCl₂ 2 - 5 M y 3) solución de lavado con solución salina tamponada con HEPES (HBS): hepes 20 mM (pH 7,0 - 7,5), KCl 140 mM, MgCl₂ 1 mM.

Soluciones de cultivo celular: 1) DMEM suplementado con 10 % de FBS certificado inactivado con calor (DMEM/FBS), 2) Medio mínimo esencial modificado de Iscoves (IMEM) suplementado con 10 % de FBS certificado inactivado con calor (IMEM/FBS), 3) Poli-L-Lisina: 0,01 % en H₂O, 4) PBS y 5) tripsina porcina/EDTA.

Procedimientos

45 Cultivo de células 293: Las células 293 pueden ser difíciles de cultivar y existe una serie de procedimientos diferentes para manipularlas. El procedimiento actual se ha usado con éxito como parte de un sistema de rescate para VSV y construcciones del vector de VSV modificado.

Subcultivo de rutina:

50 1) Eliminar el medio y lavar la monocapa confluyente (placa de 10 cm) con 5 ml de PBS templado; pipetear suavemente a lo largo del lateral de la placa para evitar el desprendimiento de las células (las células 293 dejadas a temperatura ambiente demasiado tiempo o en medio que se basicifica (rojo), se desprenderán).

2) Añadir suavemente 2 ml de tripsina y balancear la placa para cubrir toda la monocapa. Aspirar la tripsina y dejar que la placa repose a temperatura ambiente durante aproximadamente un minuto. Inclinarse la placa con un ángulo de 45 grados y darle unos golpecitos contra la superficie de trabajo de la campana para

desprender las células Si las células no se desprenden, incubar otro minuto a temperatura ambiente (asegurarse que las células se desprenden en esta etapa para que se pueda evitar un pipeteo enérgico).

3) Añadir suavemente 5 ml de DMEM/FBS y pipetear arriba y abajo lentamente para dispersar las células.

4) Añadir 1 ml de células a la placa que contiene 9 ml de DMEM/FBS.

5) Incubar a 37 °C, 5 % de CO₂.

Subcultivo para transfección:

1) Recubrir el número deseado de placas con poli-L-lisina. Añadir aproximadamente 3 - 4 ml de 0,001 % de poli-L-lisina por placa y dejarlo reposar a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos. Aspirar la solución de poli-L-lisina. Aclarar la placa con 5 ml de medio.

2) Digerir las células con tripsina como se ha descrito con anterioridad. Usar una proporción de división que de un 50 - 75 % de confluencia en la placa al día siguiente (1:3 a 1:6).

3) Después de desprender las células, añadir IMEM/FBS y transferir las células a la placa revestida que contiene 9 ml de IMEM/FBS. Parece importante dividir las células y permitir que crezcan durante la noche en IMEM/FBS antes de la transfección.

4) Incubar a 37 °C, 5 % de CO₂.

Transfección:

1) 1-3 horas antes de la transfección, alimentar las células con 9 ml de IMEM/FBS e incubar las células en un incubador a 32 °C fijado a un 3 % de CO₂.

2) Preparar la mezcla de transfección de calcio-fosfato-ADN del siguiente modo:

a) Combinar los ADN siguientes en un tubo de polipropileno de 5 ml: (i) 8 µg de T7-N, (ii) 4 µg de T7-P, (iii) 1,2 µg de T7 L, (iv) 1,0 µg de T7-M, (v) 1,0 µg de T7-G (vi) 10 µg del clon de ADNc genómico viral y (vii) 10 µg de vector de expresión hCMV-T7.

b) Ajustar el volumen a un volumen final de 450 µl con agua.

c) Añadir 50 µl de CaCl₂ 2,5M.

d) Con una suave agitación con vórtex del tubo, añadir 500 µl de 2XBBS, después dejar reposar el tubo a temperatura ambiente durante 15 - 20 minutos.

3) Retirar las células del incubador y añadir lentamente la mezcla de calcio-fosfato-ADN al medio de cultivo y agitar suavemente para distribuir el precipitado, Devolver inmediatamente las células al incubador de 32 °C-3 %CO₂.

4) Tres horas después de iniciar la transfección, sellar las placas de cultivo en una bolsa de plástico y sumergir completamente en un baño de agua fijado a 43 °C durante 2 horas para inducir la respuesta del shock térmico celular.

5) Después del shock térmico, devolver las células al incubador a 32 °C-3 % de CO₂ y seguir la incubación durante la noche.

6) Al día siguiente, lavar las células 2 veces con HBS y alimentar las células con 10 ml de IMEM/FBS. Incubar a 37 °C, 5 % de CO₂.

7) A las 48 - 72 horas del inicio de la transfección, preparar suficientes matraces T150 con 20 ml de DMEM/FBS para la transferencia de las células transfectadas al vaso más grande. Un matraz T150 por cada placa de 1 cm transfectada.

8) Transferir las células 293 transfectadas pipeteando suavemente el medio de cultivo sobre la monocapa para separarlas de la superficie celular. Evitar un pipeteo enérgico y usar solo la fuerza suficiente para separar las células. Después de separar las células, pipetear arriba y abajo aproximadamente 5 veces para reducir el tamaño de los acúmulos de células, después transferir el medio y las células a un matraz T150 con 20 ml de IMEM/FBS.

9) De cuatro a 6 horas más tarde, sustituir el medio con DMEM recién preparado suplementado con 10 % de FBS (obsérvese que esta etapa se puede retrasar hasta 24 horas si las células no se adhieren a la placa. Asimismo, esta etapa se ha omitido con éxito).

10) Vigilar las células durante 5 - 7 días para detectar pruebas del efecto citopático.

11) Cuando el ECP parece evidente, transferir 50 μ l del sobrenadante del medio a un pocillo en una placa de seis pocillos que contiene medio y una monocapa de células Vero establecida. El ECP debería ser visible al día siguiente se ha producido rescate. (Obsérvese que esta etapa es importante porque las células 293 a veces se desprenden de la superficie del matraz T150 y parecen infectadas por el VSV cuando realmente no lo están).

12) Después de transferir la pequeña muestra a la monocapa de células Vero, cosechar las células y el medio del matraz T150 y congelar a -70°C . Las células 293 generalmente se pueden cosechar mediante pipeteo del medio sobre la monocapa para desprender las células.

Rescate del virus de la estomatitis vesicular en células Vero

Soluciones

Las siguientes soluciones generalmente son útiles para la transfección de células huésped:

1) Una solución de 2XBBS (por l) (solución salina tamponada con 2XBES) de NaCl 280 mM [16,4 g de NaCl (o 56 ml de NaCl 5M)], BES 50 mM [10,7 g de BES (forma de ácido libre)] y fosfato sódico 1,5 mM [0,21 g de Na_2HPO_4]. La solución BBS se ajusta a un pH de 6,95 - 6,98 con NaOH. Después, la solución se esterilizó mediante filtración y se almacenó congelada.

2) Se prepara una solución de CaCl_2 2,5 M por 100 ml de volumen total y se almacena a -20°C . La solución se esteriliza mediante filtración usando nitrocelulosa. Se deben evitar los filtros de acetato de celulosa porque se obstruyen. Como alternativa, las soluciones de transfección se esterilizan mediante autoclave. No obstante, este último procedimiento puede ser menos deseable porque la solución 2XBBS puede cambiar ligeramente durante la esterilización en autoclave.

Las siguientes soluciones generalmente son útiles el medio.

1) Una solución en DMEM+FBS de DMEM (niveles altos de glucosa con glutamina; Gibco/BRL, [Grand Island, NY]), suplementada con 10 % de FBS inactivado con calor y certificado, y 10 - 20 $\mu\text{g/ml}$ (opcionalmente hasta 50 $\mu\text{g/ml}$) de gentamicina.

2) Una solución en MEM+FBS de MEM (suplementada con glutamina, aminoácidos no esenciales, 10 % de FBS inactivado con calor y certificado, y 10 - 20 $\mu\text{g/ml}$ (opcionalmente hasta 50 $\mu\text{g/ml}$) de tampón HEPES 20 - 25 mM, Gibco/BRL) (Grand Island, NY), incluyendo opcionalmente 1X de Fungizona).

3) Una solución en HBS de la solución de lavado de solución salina tamponada con Hepes, Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl_2 1 mM.

Procedimientos

Se puede seleccionar una célula huésped generalmente útil de las células Vero divididas, que se introducen en DMEM+FBS el día anterior a la transfección para que llegaran a una confluencia de aproximadamente el 50 % [80 - 90 % para RSV] al día siguiente (en placas de seis pocillos o matraces de 12,5 cm^2). Las densidades celulares más altas funcionan con menos eficacia. Al día siguiente, cada cultivo se alimenta 1 - 4 horas después de la transfección con 4,5 ml de DMEM+FBS. Después, las células se transfieren a un incubador en CO_2 fijado a 3 % de CO_2 y a 32°C . Las células Vero se pueden cultivar durante más tiempo que la noche siempre que lleguen a una confluencia de aproximadamente el 50 % en el momento de la transfección.

Un precipitado de CaCl_2 /fosfato se obtiene del siguiente modo: BBS y CaCl_2 se mantienen a temperatura ambiente antes de iniciar. La mezcla de ADN se prepara en un tubo de polipropileno de 5 ml que contiene un volumen total de 250 μl , con un total de 2 - 20 μg de ADN plasmídico y 25 μl de CaCl_2 . Los ADN para el rescate de longitud total incluyen 5 μg de una construcción de ADNc de longitud completa para el VSV, 400 ng de la proteína N, 100 - 200 ng de la proteína L y 5 - 10 μg del plásmido pCI-Neo-Bcl-T7 (SEC ID N° 1; Figura 2). La eficiencia del rescate en las células Vero es baja, por lo que se transfectan 3 - 6 pocillos por construcción de longitud completa rescatada.

Después de preparar todas las soluciones de DNA/ CaCl_2 se añade 2XBBS. Esto normalmente se realiza agitando suavemente un tubo mediante agitación en vórtex a baja velocidad y añadiendo gota a gota 250 μl de 2XBBS por el lateral del tubo. Esto se repite para todos los tubos, que se dejan reposar a temperatura ambiente durante 15 - 20 minutos adicionales para permitir que se forme el precipitado de ADN-fosfato cálcico. Después de la incubación a temperatura ambiente, el precipitado se añade gota a gota al medio de cultivo celular y se distribuye uniformemente balanceando la placa. Después, el medio se incuba durante tres horas en un incubador fijado a 3 % de CO_2 . Un nivel de 3 % de CO_2 es importante para la técnica de transfección de BBS/ CaCl_2 ; 5 % de CO_2 funciona muy mal, si funciona algo. El 3 % de CO_2 controla el pH del medio y permite la formación de un precipitado eficaz de calcio-fosfato-ADN en el medio.

Después, opcionalmente se lleva a cabo un procedimiento de shock térmico, por ejemplo tres horas después del inicio de la transfección. Las células se transfieren a un baño de agua fijado a 44°C . Las células se sellan en una

bolsa de almacenamiento de plástico para que los cultivos se puedan sumergir completamente en agua. Después de tres horas a 44 °C, las células se transfieren de nuevo a un incubador a 32 °C fijado a 3 % de CO₂ y la incubación continúa durante la noche.

5 Al día siguiente, el medio de transfección se retira y las células se lavan dos veces con HBS. Después de lavar, se añaden 2 ml de DMEM+FBS recién preparados. El PBS y el tampón de Hank funcionan mal en la etapa de lavado, probablemente porque el fosfato en estos tampones hace que precipite más CaCl₂ en el medio de transfección.

10 A continuación, opcionalmente se realiza un procedimiento de cocultivo. Las células transfectadas se cosechan a las 48 - 72 horas de la transfección mediante raspado en el medio y transferencia de las células más medio a un matraz T25 que contenía una monocapa confluyente al 50 % de células Vero. Seis horas después de iniciar este cocultivo, se sustituye el medio con 4 ml de MEM+FBS. Después, los cultivos se incuban durante cinco días. Si el medio comienza a parecer agitado durante este periodo de incubación, se extraen 2 ml de medio y se sustituyen con MEM+FBS recién preparado. No se recomienda sustituir todo el medio para poder conservar cualquier cantidad pequeña de virus generado durante el rescate que pueda estar en el medio. Durante esta fase de cocultivo, el ECP se puede hacer evidente, pero normalmente este no es el caso. Si no es evidente el ECP, el rescate puede continuar.

15 Las células se cosechan cinco días después de iniciar el cocultivo. Primero, se añaden al medio de cultivo 0,5 ml de sacarosa 2,18 M, KH₂PO₄ 37,6 mM, K₂HPO₄ 71,0 mM, glutamato sódico 49,0 mM y se mezclan agitando el matraz. Después, las células se vierten en el medio, se pipetea arriba y abajo para mezclar y después se alicatan en tubos para refrigeración para enviar, y después se someten a ultracongelación en un baño de hielo seco/etanol y se almacenan a -80 °C.

Purificación del vector de VSV

25 Los vectores del VSV rescatados se purificaron en placas de los sobrenadantes de las células transfectadas. Después de tres rondas sucesivas de purificaciones en placas, el virus se amplificó en células BHK para producir una reserva de semillas que, a su vez, se amplificó después en células BHK para producir una reserva de virus de trabajo. Con el fin de preparar grandes cantidades de virus para experimentos con animales, la reserva de trabajo se usó para infectar 10 - 20 matraces T-150 de células BHK confluentes a una multiplicidad de infección (M_{DI}) de 0,5 - 1,0 unidades formadoras de placas (ufp)/célula. Tras 48 horas a 32 °C, los sobrenadantes de las células infectadas se aclararon mediante centrifugación a 4.000 x g. Después, se concentró el virus de los sobrenadantes mediante centrifugación en un rotor SW 28 a 25.000 rpm durante una hora a través de una almohada de 10 % de sacarosa. Los sedimentos de virus se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se congeló instantáneamente en un baño de etanol/hielo seco. La reserva de virus concentrado se tituló después en monocapas de células Vero para determinar el número de partículas infecciosas en la preparación.

Titulación del virus

35 El número de partículas víricas infecciosas en una preparación de virus se determinó mediante un ensayo en placas estándar. En resumen, las monocapas celulares Vero frescas confluentes durante la noche en placas de seis pocillos se infectaron con diluciones de diez veces en serie de la preparación del virus. Para ello, el medio de crecimiento se aspiró de las monocapas celulares y alícuotas de 100 µl de cada dilución de virus en DMEM se transfectaron por triplicado al centro de las monocapas de células. Para prevenir la desecación celular se añadieron 400 µl de DMEM a cada monocapa celular y las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante quince minutos, seguido de incubación de treinta minutos a 37 °C, 5 % CO₂, con agitación ocasional. Después se extrajo el inóculo del virus y cada monocapa celular se cubrió con 3 ml de 0,8 % de agarosa en DMEM. A continuación, las placas se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 1 - 4 días para permitir la formación de placas. Después se retiraron los tapones de agarosa y las células se tiñeron con cristal violeta (2 % cristal violeta en 50 % de metanol) durante diez minutos a temperatura ambiente. A continuación se retiró el exceso de tinción y las monocapas celulares se aclararon minuciosamente con agua. Después, las placas de virus se visualizaron en la monocapa celular como pequeños agujeros que no se habían teñido de azul.

Cuantificación del ARN viral mediante PCR en tiempo real

50 Se usó un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (RT/PCR) para la detección y cuantificación de los genomas del VSV en el tejido de los animales. El ensayo usa un abordaje de RT/PCR de 2 etapas que detecta específicamente el ARN genómico del virus de sentido negativo t usa un oligonucleótido sintético de todo el amplicón para el desarrollo de una curva patrón. En resumen, los tejidos cerebrales de monos, hurones t ratones se homogeneizaron como una suspensión espesa del 20 % en peso/volumen en SPG. La suspensión espesa se centrifugó a 3.000 x g durante quince minutos para sedimentar la materia particulada. Después, el sobrenadante se centrifugó a 14.000 x g y se extrajo el ARN total del sobrenadante resultante. Este ARN se usó como molde para transcripción inversa con cebadores específicos del virus y a continuación se usaron los productos para el ensayo de PCR en tiempo real.

Determinación de la dosis letal al 50 % (DL₅₀) de los vectores del VSV en ratones

El modelo de DL₅₀ de ratón se usó como medida de la atenuación relativa de los vectores del VSV. Varias diluciones log del VSV salvaje, 3'-NPMG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-1)L-5', y 3'-PMNG_(ct-1)L-5' se inyectaron por vía intracraneal en ratones hembra Swiss Webster de cuatro semanas y media de edad (6 - 10 ratones por grupo). Se siguió a los ratones para vigilar la pérdida de peso, parálisis y muerte (DL₅₀) durante tres semanas. La DL₅₀ se calculó a partir del porcentaje de mortalidad acumulada mediante el método de Reed y Muench.

Estudios de inmunogenicidad en ratones

Los ratones (n=15) fueron inmunizados por vía intramuscular con 1 x 10⁷ ufp de los vectores de VSV indicados (serotipo Indiana) establecidos en el Ejemplo 4. Los esplenocitos de un conjunto de ratones ("Sensibilización", n= 5) se aislaron al máximo de la fase efectora 7 días después de la sensibilización. Se administró a dos conjuntos de ratones (n=10) refuerzos con 1 x 10⁷ ufp del vector de VSV indicado (versión intercambio NJ-G). Los esplenocitos de un conjunto de ratones ("Refuerzo", n= 5) se aislaron al máximo de la fase efectora 5 días después de la administración del refuerzo. Los esplenocitos de otro conjunto de ratones (Memoria, n=5) se aislaron durante la fase de memoria 30 días después de la administración del refuerzo. Las frecuencias de linfocitos T CD8 específicos de gag se determinaron mediante tinción del tetrámero. La secreción de IFN-γ específica de Gag se determinó mediante ELISPOT tras estimulación durante la noche con el péptido inmunodominante gag.

Ejemplo 2

Caracterización de mutantes del VSV

Se observaron sustanciales diferencias entre los tamaños de la placa de los vectores VSV de dos clases de mutación combinadas descritos en el ejemplo 1 (con barajado de N/truncamiento ct de la proteína G) frente a los vectores de VSV de una sola clase de mutación (Tabla 5) Normalmente, los vectores de VSV de una sola clase de mutación formaron placas de tamaño contable en un ensayo con placas de veinticuatro horas, mientras que algunos de los vectores con barajado de N/truncamiento ct de la proteína G requirieron de tres a cuatro días para formar placas de tamaño equivalente. Las diferencias relativas en el tamaño de la placa para los vectores del VSV también fueron paralelas a las diferencias relativas observadas durante los estudios de la cinética del crecimiento en cultivo celular (FIG. 1 a FIG. 3).

TABLA 5

TAMAÑO RELATIVO DE LA PLACA DE LOS VECTORES DE VSV		
Vector de VSV	Tamaño de la placa a las 48 horas de la infección	
3'-NPMGL-5'	5+	
3'-PMNGL-5'	3+	
3'-NPMG _(ct-1) L-5'	2+	
3'-PNMG _(ct-1) L-5'	1+	
3'-PMNG _(ct-1) L-5'	0,5+	

Ejemplo 3

Estudios de neurovirulencia del VSV

La atenuación sinérgica del VSV que comprende una combinación de dos o más clases de mutación respecto a los vectores mutantes de VSV de una sola clase se evaluó en una serie de estudios de neurovirulencia de ratones, hurones y monos., cuyos procedimientos se describen en el Ejemplo 1. Los ratones son muy permisivos a la replicación del VSV y su propiedad permite su uso para discriminar diferentes niveles de crecimiento y atenuación víricos. Se observó un claro gradiente de patogenicidad/atenuación en ratones para los diferentes vectores del VSV (Tabla 6 y Tabla 7). Por ejemplo, la DL₅₀ en ratones a los que se ha inoculado por vía intracraneal 3'-NPMGL-5', 3'-NPMG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-1)L-5' o 3'-PMNG_(ct-1)L-5' (Tabla 6) indicó el siguiente gradiente de atenuación relativa: 3'-PMNG_(ct-1)L-5' (DL₅₀ = 2 x 10⁵) > 3'-PNMG_(ct-1)L-5' (DL₅₀ = 1 x 10⁴) > 3'-NPMG_(ct-1)L-5' (DL₅₀ =14,5) > 3'-NPMGL-5'(DL₅₀ = 3,2).

TABLA 6

NÚMERO DE RATONES MUERTOS O PARALIZADOS						
Vector	Dosis IC (ufp)					
	1	10	100	1.000	10.000	100.000
3'-NPMG _(ct-1) L-5' (DL ₅₀ = 14,5 ufp)	ND	3 murieron	5 murieron	6 murieron	6 murieron	ND
3'-PNMG _(ct-1) L-5' (DL ₅₀ = 1 x 10 ⁴ ufp)	ND	2 paralizados	3 murieron 1 paralizado	1 murió 1 paralizado	1 murió 1 paralizado	ND
3'-PMNG _(ct-1) L-5' (DL ₅₀ > 2 x 10 ⁵ ufp)	ND	ND	1 murió 1 paralizado	1 paralizado	3 paralizados	2 murieron 4 paralizados
3-NPMGL-5' (wt) (DL ₅₀ = 3,2 ufp)	1 murió	5 murieron	6 murieron	6 murieron	ND	ND

Se inoculó en 6 ratones cada uno de los vectores anteriores por vía intracraneal (IC).

5 La LD₅₀ en ratones a los que se inyectó por vía intracraneal los vectores del VSV con cero (VSV salvaje), una, dos, tres y cuatro (inserción del gen *gag*) clases de mutación, mostradas más adelante en la Tabla 7, también exhibieron un gradiente de atenuación similar. Adicionalmente, los ratones a los que se inyectó por vía intracraneal los vectores del VSV 3'-gag₁-PMNG_(ct1)L-5', 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5', 3'-gag₁-NPMGL_(ts)-5', 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct1)L-5', 3'-gag₁-PMNG_(ct9)L_(ts)-5' y 3'-gag₁-NPMG_(tallo)L-5' no exhibieron mortalidad alguna.

TABLA 7

NEUROVIRULENCIA INTRACRANEAL DE LOS VECTORES DE VSV EN RATONES		
Vector	DL ₅₀ (ufp)	Nº de clases de mutación
3'-NPMGL-5'(VSVwt)	3,2	0
3'-NPMGL-5' (VSVr)	10	0
3'-NPMG-gag ₅ -L-5'	10	1
3'-PNMGL-5'	12	1
3'-PMNGL-5'	14	1
3'-NPMG _(ct-1) L-5'	14,5	1
3'-NPMG _(ct-1) -gag ₅ -L-5'	24	2
3'-gag ₁ -NPMGL-5'	115	1
3'-PNMG _(ct-1) L-5'	1×10 ⁴	2
3'-PMNG _(ct-1) L-5'	2×10 ⁵	2
3'-gag ₁ -PMNG _(ct-9) L-5'	1×10 ⁶	3
3'-gag ₁ -PNMG _(ct-1) L-5'	1×10 ⁶	3
3'-NPM _(ncp) G-gag ₅ -L-5'	> 1×10 ⁶	2
3'-gag ₁ -N _(ts) PMGL-5'	8×10 ⁶	2
3'-PMNG _(ct-1) -gag ₅ -L-5'	1×10 ⁷	3
3'-NPM _(ncp) G _(ct-1) -gag ₅ -L-5'	> 1×10 ⁷	3
3'-gag ₁ -PMNG _(ct-1) L-5'	> 1×10 ⁷	3
3'-gag ₁ -N _(ts) PMGL _(ts) -5'	> 1×10 ⁷	3
3'-gag ₁ -NPMGL _(ts) -5'	> 1×10 ⁷	2

NEUROVIRULENCIA INTRACRANEAL DE LOS VECTORES DE VSV EN RATONES		
Vector	DL ₅₀ (ufp)	Nº de clases de mutación
3'-gag ₁ -NPM _(ncp) G _(ct-1) L-5'	> 1×10 ⁷	3
3'-gag ₁ -PMNG _(ct-1) L _(ts) -5'	> 1×10 ⁷	4
3'-gag ₁ -NPMG _(tallo) L-5'	> 1×10 ⁷	2

Los datos histopatológicos de monos cinomolgos a los que se inoculó por vía intratálamica la misma serie de vectores indicaron un gradiente de atenuación muy similar. Ambos conjuntos de datos de animales se corroboraron después con los resultados de una serie de estudios de neurovirulencia en hurones, en los que se midieron los virus infecciosos y los niveles de ARN genómico presentes en los cerebros de los animales inoculados intracranalmente mediante ensayo de placas y PCR en tiempo real, respectivamente. En conjunto, estos datos demuestran que la combinación de dos o más clases de mutación posee un nivel de atenuación que es sustancialmente superior al de los vectores de VSV de una sola clase de mutación. Los títulos de la DL₅₀ de ratón indican considerablemente que existe un potente efecto sinérgico sobre la atenuación combinando dos clases de mutación diferentes en el mismo vector del VSV.

Ejemplo 4

Inmunogenicidad potenciada de los vectores de VSV atenuados

La inmunogenicidad de los vectores de VSV atenuados 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct1)L-5', 3'-gag₁-PMNG_(ct9)L-5' y 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' se compararon con los vectores prototipo de VSV 3'-NPMG-gag₅-L-5' y 3'-NPMGL-5'. Se inmunizó a los ratones con uno de los vectores del VSV anteriores, como se describe en el Ejemplo 1. Los vectores de VSV atenuados indujeron respuestas inmunitarias que fueron más fuertes que las inducidas por el vector prototipo VSV-Gag₅ (3'-NPMG-gag₅-L-5'). El más importante fue 3'-gag₁-PMNG_(ct9)L-5', que indujo frecuencias de linfocitos T específicos de Gag estadísticamente significativamente más altas que las inducidas por el prototipo cuando se evaluó después de la sensibilización y el refuerzo, así como durante la fase de memoria de la respuesta (Tabla 8).

TABLA 8

Vector	FRECUENCIAS DE LOS LINFOCITOS T CD8 ESPECÍFICOS DE GAG		
	Porcentaje Linfocitos T CD8 positivos del tetrámero gag		
	Sensibilización	Refuerzo	Memoria
3'-NPMGL-5'	0,24	0,15	0,21
3'-NPMG-gag ₅ -L-5'	1,46	2,29	0,92
3'-gag ₁ -NPM _(ncp) G _(ct1) L-5'	0,96	3,42	2,25
3'-gag ₁ -PMNG _(ct9) L-5'	2,29*	8,68*	3,13*
3'-gag ₁ -N _(ts) PMGL _(ts) -5'	0,66	3,59	0,21

* = respuesta significativamente mayor que la observada para 3'-NPMG-gag₅-L-5' (prueba t de student, p< 0,05).

3'-gag₁-PMNG_(ct9)L-5' también indujo secreción de IFN-γ que tendía a ser más alta que la inducida por el prototipo 3'-NPMG-gag₅-L-5' (Tabla 9). Las respuestas a 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct1)L-5' y 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' también tendían a ser más altas que las inducidas por el prototipo 3'-NPMG-gag₅-L-5' (Tabla 9).

25

TABLA 9

ELISPOT DE GAG IFN- γ			
Manchas de IFN- γ por 1×10^6 células de bazo			
Vector	Sensibilización	Refuerzo	Memoria
3'-NPMGL-5'	0	1	0
3'-NPMG-gag ₅ -L-5'	680	887	196
3'-gag ₁ -NPM _(ncp) G _(ct1) L-5'	372	984	668*
3'-gag ₁ -PMNG _(ct9) L-5'	908	1.552	496
3'-gag ₁ -N _(ts) PMGL _(ts) -5'	129	632	413

* = respuesta significativamente mayor que la observada para 3'-NPMG-gag₅-L-5' (prueba t de student, p < 0,05).

Ejemplo 5

5 **Inmunogenicidad de la administración intramuscular e intranasal de vectores de VSV atenuados que expresan Gag del VIH en macacos rhesus**

Los siguientes estudios se han diseñado para medir las respuestas inmunitarias provocadas en macacos rhesus tras la inmunización con vectores de VSV atenuados que expresan la proteína gag del VIH.

10 El estudio expuesto en la Tabla 10 se realiza con un total de veinticuatro macacos rhesus no seleccionados genéticamente, en el que cada grupo de animales (es decir, grupos 1 – 6) se inmuniza por vía intramuscular o intranasal con uno de los vectores de VSV siguientes a una dosis de 1×10^7 (ufp): 3'-gag₁-N_(ts)PMGL_(ts)-5' (TsN+L), 3'-gag₁-PMNG_(ct9)L-5' (N4CT9) o 3'-NPMG-gag₅-L-5' (Gag5).

15 El estudio expuesto en la Tabla 11 se realiza con un total de veinticuatro macacos rhesus no seleccionados genéticamente, en el que cada grupo de animales (es decir, grupos 1 – 8) se inmuniza por vía intramuscular o intranasal con uno de los vectores de VSV siguientes a una dosis de 1×10^7 (ufp): 3'-gag₁-NPM_(ncp)G_(ct1)L-5' (MncpCT1), 3'-gag₁-NPMG_(tallo)L-5' (G Tallo), 3'-gag₁-PMNG_(ct1)L-5' (N4CT1) o 3'-NPMG-gag₅-L-5' (Gag5).

Generalmente, se usan los ensayos siguientes para analizar las respuestas inmunitarias sistémicas y humorales y la eliminación del VSV de cada animal:

20 Respuestas inmunitarias celulares: respuesta en ELISPOT IFN- γ específica del péptido gag del VIH y respuesta en ELISPOT IFN- γ específica del péptido N del VSV. Respuesta inmunitaria humoral: títulos de anticuerpos anti-gag del VIH en suero mediante ELISA, títulos de anticuerpos anti-VSV en suero mediante ELISA y títulos de anticuerpos neutralizantes anti-VSV en suero.

TABLA 10

ESTUDIO DE INMUNOGENICIDAD EN PRIMATES					
Grupo	Nº de animales	Sensibilización (serotipo Indiana)	Refuerzo (serotipo New Jersey)	Dosis	Vía
1	5	TsN+L	TsN+L	1×10^7	IM
2	5	TsN+L	TsN+L	1×10^7	IN
3	5	N4CT9	N4CT9	1×10^7	IM
4	5	N4CT9	N4CT9	1×10^7	IN
5	2	Gag 5	Gag 5	1×10^7	IM
6	2	Gag 5	Gag 5	1×10^7	IN

La vía IM es intramuscular.
La vía IN es intranasal.

TABLA 11

ESTUDIO DE INMUNOGENICIDAD EN PRIMATES					
Grupo	Nº de animales	Sensibilización (serotipo Indiana)	Refuerzo (serotipo New Jersey)	Dosis	Vía
1	5	Mncp CT1	Mncp CT1	1 x 10 ⁷	IM
2	5	Mncp CT1	Mncp CT1	1 x 10 ⁷	IN
3	5	Tallo G	Tallo G	1 x 10 ⁷	IM
4	5	Tallo G	Tallo G	1 x 10 ⁷	IN
5	5	N4CT1	N4CT1	1 x 10 ⁷	IM
6	5	N4CT1	N4CT1	1 x 10 ⁷	IN
7	2	Gag 5	Gag 5	1 x 10 ⁷	IM
8	2	Gag 5	Gag 5	1 x 10 ⁷	IN

La vía IM es intramuscular.
La vía IN es intranasal.

REFERENCIAS

- 5 Patente de Estados Unidos 5.258.454
Patente de Estados Unidos 5.556.747
Patente de Estados Unidos 5.789.166
Patente de Estados Unidos 6.391.548
Patente de Estados Unidos 5.817.879
- 10 Patente de Estados Unidos 6.168.943
Patente de Estados Unidos 6.596.529
Patente de Estados Unidos 6.033.886
Patente de Estados Unidos 6.673.572
Patente provisional de EE.UU. 60/477.389
- 15 Ahmed y Lyles, "Identification of a Consensus Mutation in M Protein of Vesicular Stomatitis Virus from Persistently Infected Cells that Affects Inhibition of Host-directed Gene Expression" *Virology*, 237(1): 378 - 88, 1997.
Atkinson y col., *United States. Annu. Rev. Med.*, 43:451 - 463, 1992.
- 20 Ball y col., "Phenotypic consequences of rearranging the P, M, and G genes of vesicular stomatitis virus" *Journal of virology*, 73(6):4705 - 4712, 1999.
Bellini y col., *Emerging Infectious Diseases*, 4:29 - 35, 1998.
Canto y col., "Status Spongiosus Resulting from Intracerebral Infection of Mice with Temperature-Sensitive Mutants of Vesicular Stomatitis Virus", *Br. J. exp. Path.*, 57:321 - 330.1976.
Collins y col., *Adv. Virus. Res.*, 54:423 - 451, 1999.
- 25 Collins y col., *Respiratory Syncytial Virus*. In "Field's Virology", 3rd Edition, Lippincott-Raven, 1443 - 1475, 2001.
Cutts y col., *J. Infectious. Dis.*, 170:S32-S41, 1994.

- Evans y col., "Temperature-sensitive mutants of complementation group E of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype possess altered NS polypeptides", *Journal of Virology*, 31(2):325 - 333, 1979.
- Finke y Conzelmann, "Ambisense gene expression from recombinant rabies virus: random packaging of positive- and negative-strand ribonucleoprotein complexes into rabies virions", *J. Virol.*, 71:7281 - 7288, 1997.
- 5 Finke y Conzelmann, "Virus promoters determine interference by defective RNAs: selective amplification of mini-RNA vectors and rescue from cDNA by a 3' copy-back ambisense rabies virus", *J. Virol.*, 73: 3818 - 3825, 1999.
- Flamand y Bishop, "Primary In Vivo Transcription of Vesicular Stomatitis Virus and Temperature-Sensitive Mutants of Five Vesicular Stomatitis Virus Complementation Groups", *J. of Virology*, 12(6):1238 - 1252, 1973.
- 10 Flamand y Pringle, "The homologies of spontaneous and temperature-sensitive mutants of vesicular stomatitis virus isolated in chick embryos and BHK-21 cells", *J. Gen. Virol.*, 11:81 - 85.1971.
- Flanagan y col., "Rearrangement of the genes of vesicular stomatitis virus eliminates clinical disease in the natural host: new strategy for vaccine development", *J. Virology*, 75:6107 - 6114, 2001.
- 15 Fredericksen y Whitt, "Attenuation of recombinant vesicular stomatitis viruses encoding mutant glycoproteins demonstrate a critical role for maintaining a high pH threshold for membrane fusion in viral fitness", *Virology*, 240: 349 - 58, 1997.
- Gallione y col., "Nucleotide Sequences of the mRNA's encoding the Vesicular Stomatitis Virus N and NS Proteins", *J. Virol.*, 39:529 - 535, 1981.
- 20 Gopalakrishna y Lenard, "Sequence alterations in temperature-sensitive M-protein mutants (complementation group III) of vesicular stomatitis virus", *Journal of Virology*, 56(3):655 - 659.1985.
- Griffin, Measles Virus. In "Field's Virology", 3rd Edition, Lippincott-Raven, 1401 - 1442.2001.
- Harty y col., "A Proline-Rich Motif within the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus and Rabies Virus Interacts with WW Domains of Cellular Proteins: Implications for Viral Budding", *J. Virology*, 73(4):2921 - 2929, 1999.
- 25 Holloway y col., "Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of vesicular stomatitis virus", *Virology*, 42(4):917 - 26, 1970.
- Irie y col., "Functional Analysis of Late-Budding Domain Activity Associated with the PSAP Moif within the Vesicular Stomatitis Virus M Protein", *J. Virology*, 78(14):7823 - 7827, 2004.
- 30 Jayakar y Whitt, "Identification of two additional translation products from the matrix (M) gene that contribute to vesicular stomatitis virus Cytopathology", *Journal of Virology*, 76(16):8011 - 8018, 2002.
- Jayakar y col., "Mutations in The PPPY Motif of Vesicular Stomatitis Virus Matrix Protein Reduce Virus Budding by Inhibiting a Late Step in Virion Release", *Journal of Virology*, 74(21):9818 - 27, 2000.
- Jeetendra y col., "The Membrane-Proximal Domain of Vesicular Stomatitis Virus G Protein Functions as a Membrane Fusion Potentiator and Can Induce Hemifusion", *Journal of Virology*, 76(23):12300 - 11, 2002.
- 35 Jeetendra y col., "The Membrane-Proximal Region of Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G Ectodomain Is Critical for Fusion and Virus Infectivity", *Journal of Virology*, 77(23):12807 - 18, 2003.
- Kapikian y col., *Am. J. Epidemiol.* 4:405 - 21, 1969.
- Kim y col., *Am. J. Epidemiol.* 4:422 - 34.1969.
- 40 Li y col., "Site-specific mutations in vectors that express antigenic and temperature-sensitive phenotypes of the M gene of vesicular stomatitis virus", *Journal of Virology*, 62(10):3729 - 3737.1988.
- Lundh y col., "Non-Lethal Infection of Aminergic Reticular Core Nuerons: Age-Dependent Spread of ts Mutant Vesicular Stomatitis Virus from the Nose", *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 47(5):497 - 506, 1988.
- 45 Morita y col., "Phenotypic revertants of temperature-sensitive M protein mutants of vesicular stomatitis virus: sequence analysis and functional characterization", *Journal of Virology*, 61 (2):256 - 263, 1987.
- Pringle y col., "Enhanced mutability associated with a temperature-sensitive mutant of vesicular stomatitis virus", *Journal of Virology*, 39(2):377 - 389, 1981.

- Pringle y col., "Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of vesicular stomatitis virus, New Jersey serotype", *Journal of Virology*, 8(6):836 - 841.1971.
- Pringle, "Genetic Characteristics of Conditional Lethal Mutants of Vesicular Stomatitis Virus Induced by 5-Fluorouracil, 5-Azacytidine, and Ethyl Methane Sulfonate", *Journal of Virology*, 5(5):559 - 567, 1970.
- 5 Printz y Wagner, "Temperature-Sensitive Mutants of Vesicular Stomatitis Virus: Synthesis of Virus Specific Proteins", *J. of Virology*, 7(5):651 - 662.1971.
- Rabinowitz y col., "Comparison of Central Nervous System Disease Produced by Wild-Type and Temperature-Sensitive Mutants of Vesicular Stomatitis Virus", *Infection and Immunity*, 13(4):1242 - 1249, 1976.
- 10 Rabinowitz y col., "The Uncoupled Relationship Between the Temperature-Sensitivity and Neurovirulence in Mice of Mutants of Vesicular Stomatitis Virus", *J. gen. Virol*, 35:237 - 249.1977.
- Roberts y col., "Vaccination with a Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Expressing an Influenza Virus Hemagglutinin Provides Complete Protection from Influenza Virus Challenge", *Journal of Virology*, 73:3723 - 3732, 1999.
- 15 Robinson y Whitt, "The Membrane-Proximal Stem Region of Vesicular Stomatitis Virus G Protein Confers Efficient Virus Assembly", *Journal of Virology*, 74(5):2239 - 2246, 2000.
- Rose y Gallione, "Nucleotide Sequences of the mRNA's encoding the Vesicular Stomatitis Virus G and M Proteins Determined from cDNA Clones Containing the Complete Coding Regions", *J. Virol*, 39:519+-528, 1981.
- 20 Rose y col., "An Effective Aids Vaccine Based on Live Attenuated Vesicular Stomatitis Virus Recombinants", *Cell*, 106(5):539 - 49, 2001.
- Rose y col., "Glycoprotein Exchange Vectors Based on Vesicular Stomatitis Virus Allow Effective Boosting and Generation of Neutralizing Antibodies to a Primary Isolate of Human Immunodeficiency Virus Type 1", *Journal of Virology*, 74(23):10903 - 10, 2000.
- 25 Schlehner y Rose, "Vesicular Stomatitis Virus (VSV) Recombinants Expressing the HIV-1 2F5 Epitope Within the VSV G Protein", *Abstract Number 321, AIDS Vaccine 2003, New York, September, 2003.*
- Schlereth y col., "Successful Mucosal Immunization of Cotton Rats in the Presence of Measles-Specific Antibodies Depends on Degree of Attenuation of Vaccine Vector and Virus Dose", *Journal of General Virology*, 84:2145 - 2151, 2003.
- 30 Schlereth y col., "Successful vaccine-induced seroconversion by single-doses immunization in the presence of measles virus-specific material antibodies", *J. Virology*, 74:4652 - 4657, 2000.
- Schnell y col., "Requirement for a Non-Specific Glycoprotein Cytoplasmic Domain Sequence to Drive Efficient Budding of Vesicular Stomatitis Virus", *The EMBO Journal*, 17(5):1289 - 1296, 1998.
- 35 Schnell y col., "Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles", *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A*, 93:11359 - 11365, 1996.
- Wagner, "Pathogenicity and Immunogenicity for Mice of Temperature-Sensitive Mutants of Vesicular Stomatitis Virus", *Infection and Immunity*, 10(2):309 - 315.1974.
- Wertz y col., "Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:3501 - 3506, 1998.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un virus de la estomatitis vesicular (VSV) modificado genéticamente que comprende dos mutaciones que son una mutación del gen G truncado en el dominio citoplasmático y una mutación por barajado del gen N, de forma que el gen N es desplazado desde su posición salvaje proximal al promotor en 3' a una posición más distal en el orden de los genes del VSV, en el que las dos mutaciones atenúan de forma sinérgica la patogenicidad del VSV, en el que la patogenicidad se define además como neurovirulencia.
2. El VSV de la reivindicación 1, en el que la proteína G codificada por el gen G truncado tiene una delección de los últimos veinte o veintiocho aminoácidos en el extremo carboxi.
- 10 3. El VSV de la reivindicación 1, en el que la proteína G codificada por el gen G truncado tiene un dominio de cola citoplasmática que consiste en uno o nueve aminoácidos.
4. El VSV de la reivindicación 1, en el que el gen N se baraja a 3'-PNMGL-5' o 3'-PMNGL-5', en relación con el genoma del VSV salvaje 3'-NPMGL-5', en el que N es el gen que codifica la proteína de la nucleocápside, P es el gen que codifica la fosfoproteína, M es el gen que codifica la proteína de la matriz, G es el gen que codifica la glicoproteína de unión y L es el gen que codifica la proteína ARN polimerasa dependiente de ARN.
- 15 5. El VSV de la reivindicación 1, que comprende un genoma mutado seleccionado del grupo que consiste en 3'-PNMG_(ct-1)L-5', 3'-PNMG_(ct-9)L-5', 3'-PMNG_(ct-1)L-5' y 3'-PMNG_(ct-9)L-5', en el que N es el gen que codifica la proteína de la nucleocápside, P es el gen que codifica la fosfoproteína, M es el gen que codifica la proteína de la matriz, G_(ct-1) es el gen que codifica la glicoproteína de unión que tiene una delección de los últimos veintiocho aminoácidos en el extremo carboxi, G_(ct-9) el gen que codifica la glicoproteína de unión que tiene una delección de los últimos veinte aminoácidos en el extremo carboxi y L es el gen que codifica la proteína ARN polimerasa dependiente de ARN.
- 20 6. El VSV de la reivindicación 5, que además comprende una tercera clase de mutación en su genoma, en el que la mutación es una mutación ts, una mutación en el ARN ambisentido, una mutación no citopática en el gen M, una mutación por delección génica, una mutación por inserción génica o una mutación puntual.
- 25 7. El VSV de la reivindicación 1, en el que el VSV cuando se inyecta por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad tiene una DL₅₀ 100 veces, 1.000 veces, 10.000 veces o 100.000 veces mayor que el VSV salvaje cuando se inyecta por vía intracraneal en ratones Swiss-Webster hembra de 4 semanas de edad.
8. Un vector del VSV modificado genéticamente que comprende un VSV modificado genéticamente que comprende dos mutaciones que son una mutación del gen G truncado en el dominio citoplasmático y una mutación por barajado del gen N, de forma que el gen N es desplazado desde su posición salvaje proximal al promotor en 3' a una posición más distal en el orden de los genes del VSV, en el que las dos mutaciones atenúan de forma sinérgica la patogenicidad del VSV, en el que la patogenicidad se define además como neurovirulencia y que comprende adicionalmente al menos una secuencia de ARN extraño insertada en, o sustituyendo a, una región del genoma del VSV no esencial para la replicación.
- 30 9. El vector de la reivindicación 8, en el que el ARN extraño se define además como un marco de lectura abierto (ORF).
- 35 10. El vector de la reivindicación 8, en el que el ARN extraño es seleccionado del grupo que consiste en un gen del VIH, un gen del HTLV, un gen del SIV, un gen del RSV, un gen del PIV, un gen del HSV, un gen del CMV, un gen del virus de Epstein-Barr, un gen del virus de varicela zóster, un gen del virus de la parotiditis, un gen del virus del sarampión, un gen del virus de la gripe, un gen del poliovirus, un gen del rinovirus, un gen del virus de la hepatitis A, un gen del virus de la hepatitis B, un gen del virus de la hepatitis C, un gen del virus Norwalk, un gen del togavirus, un gen del alfavirus, un gen del virus de la rubéola, un gen del virus de la rabia, un gen del virus Marburg, un gen del virus ébola, un gen del virus del papiloma, un gen del virus del polioma, un gen del metapneumovirus, un gen del coronavirus, un gen de *Vibrio cholerae*, un gen de *Streptococcus pneumoniae*, un gen de *Streptococcus pyogenes*, un gen de *Helicobacter pylori*, un gen de *Streptococcus agalactiae*, un gen de *Neisseria meningitidis*, un gen de *Neisseria gonorrhoeae*, un gen de *Corynebacteria diphtheria*, un gen de *Clostridium tetani*, un gen de *Bordetella pertussis*, un gen de *Haemophilus*, un gen de *Chlamydia*, un gen de *Escherichia coli*, un gen que codifica una citocina, un gen que codifica un epítipo de los linfocitos T colaboradores, un gen que codifica un epítipo de CTL, un gen que codifica un adyuvante y un gen que codifica un cofactor.
- 40 11. El vector de la reivindicación 10, en el que el gen del VIH es seleccionado del grupo que consiste en *gag*, *env*, *pol*, *vif*, *nef*, *tat*, *vpr*, *rev* y *vpu*.
- 45 12. Una composición inmunogénica que comprende una dosis inmunogénica de un vector del VSV modificado genéticamente de la reivindicación 8.
- 50 13. Uso de una dosis inmunogénica del vector del VSV de la reivindicación 8 en la preparación de un medicamento para inmunizar un huésped de mamífero contra la infección bacteriana, en el que la secuencia de ARN extraño codifica una proteína bacteriana seleccionada del grupo que consiste en una proteína de *Vibrio cholerae*, una proteína de *Streptococcus pneumoniae*, una proteína de *Streptococcus pyogenes*, una proteína de *Streptococcus*
- 55

agalactiae, una proteína de *Helicobacter pylori*, una proteína de *Neisseria meningitidis*, una proteína de *Neisseria gonorrhoeae*, una proteína de *Corynebacteria diphtheriae*, una proteína de *Clostridium tetani*, una proteína de *Bordetella pertussis*, una proteína de *Haemophilus*, una proteína de *Chlamydia* y una proteína de *Escherichia coli*.

- 5 14. Uso de una dosis inmunogénica del vector del VSV de la reivindicación 8 en la preparación de un medicamento para inmunizar un huésped de mamífero contra la infección viral en el que la secuencia de ARN extraño codifica una proteína viral seleccionada del grupo que consiste en una proteína del VIH, una proteína del HTLV, una proteína del SIV, una proteína del RSV, una proteína del PIV, una proteína del HSV, una proteína del CMV, una proteína del virus de Epstein-Barr, una proteína del virus de varicela-zóster, una proteína del virus de la parotiditis, una proteína del virus del sarampión, una proteína del virus de la gripe, una proteína del poliovirus, una proteína del rinovirus,
- 10 una proteína del virus de la hepatitis A, una proteína del virus de la hepatitis B, una proteína del virus de la hepatitis C, una proteína del virus Norwalk, una proteína del togavirus, una proteína del alfavirus, una proteína del virus de la rubéola, una proteína del virus de la rabia, una proteína del virus Marburg, una proteína del virus ébola, una proteína del virus del papiloma, una proteína del virus del polioma, una proteína del metapneumovirus y una proteína del coronavirus.
- 15

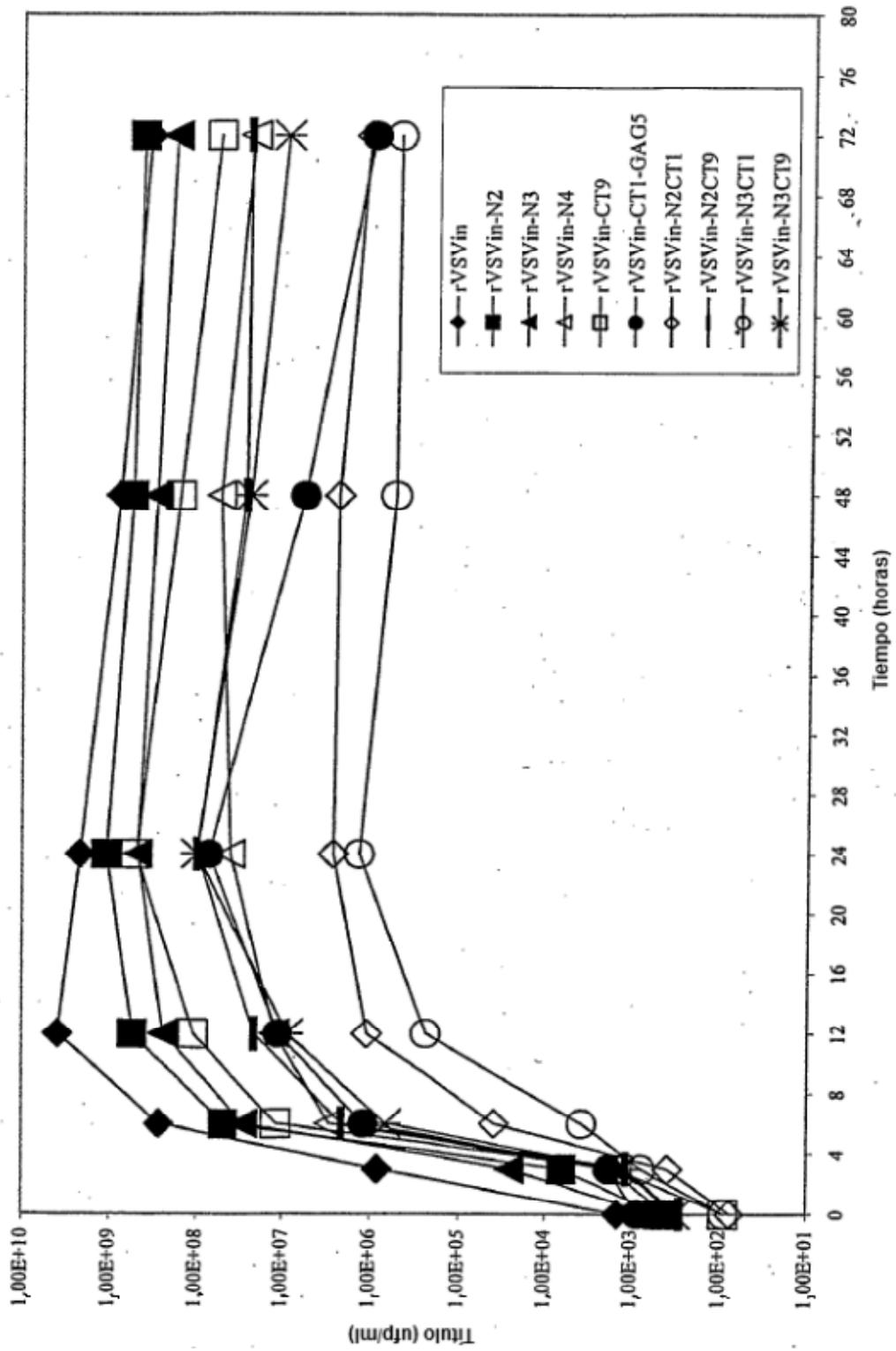


FIG. 1

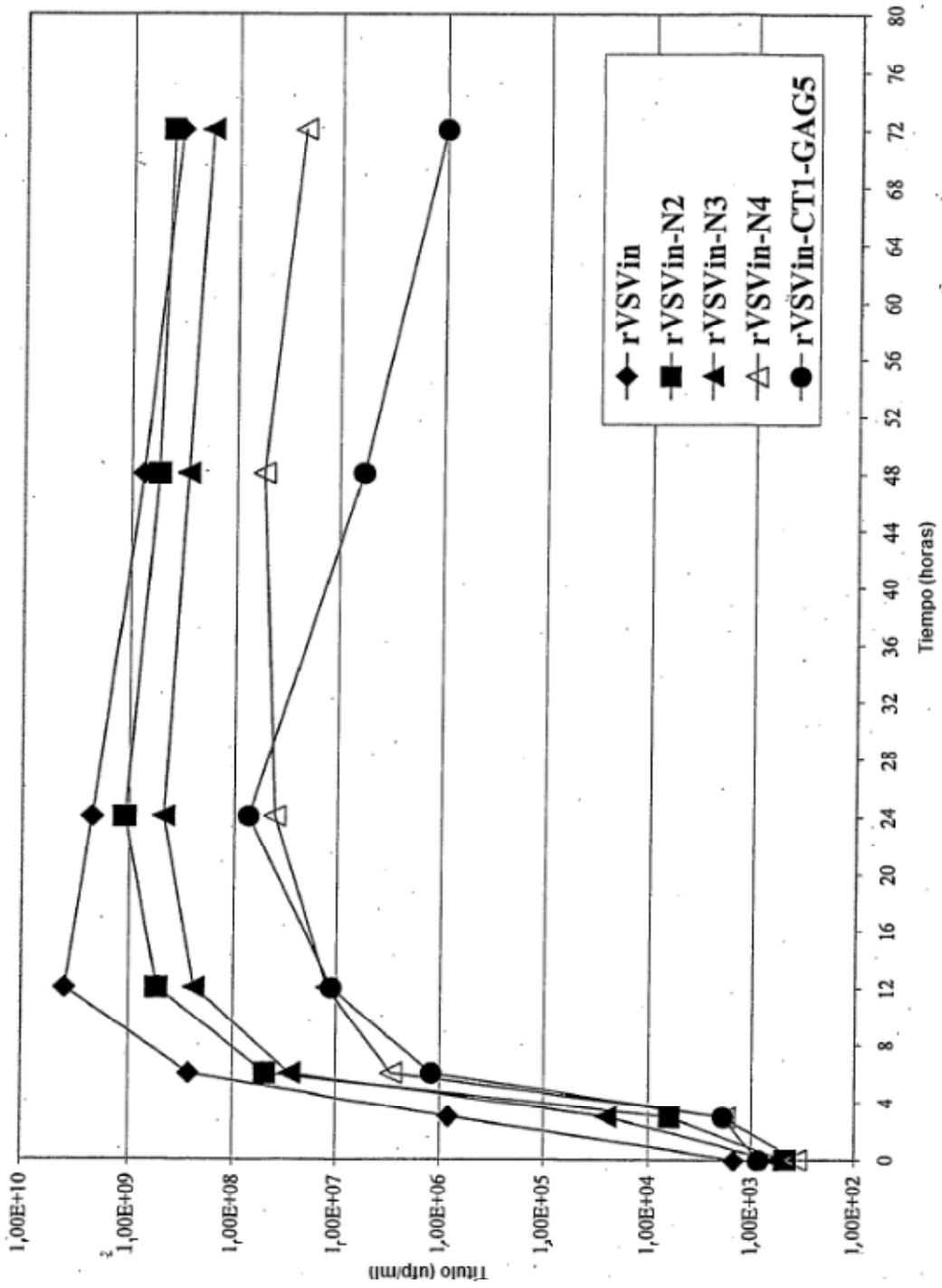


FIG. 2

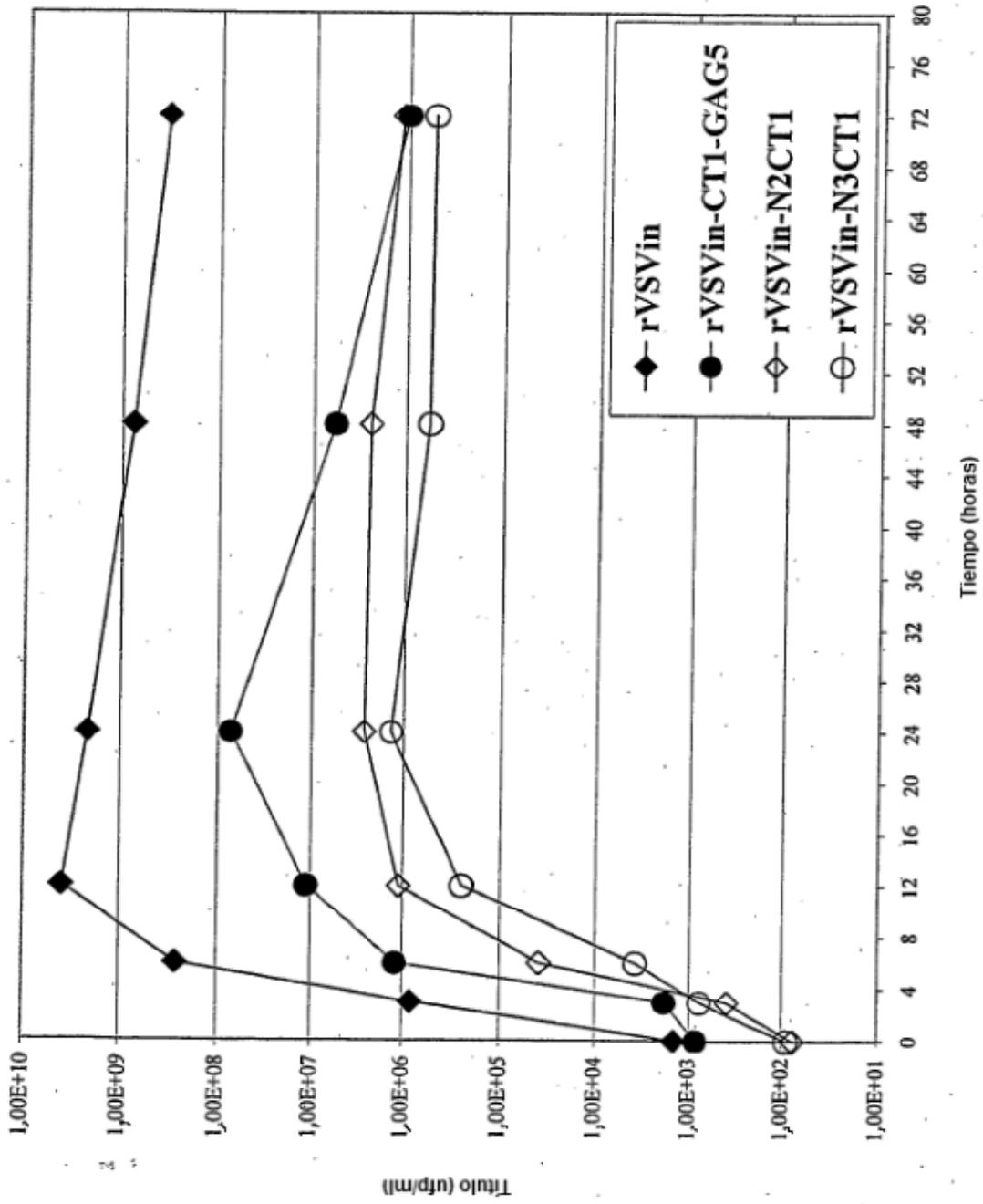


FIG. 3