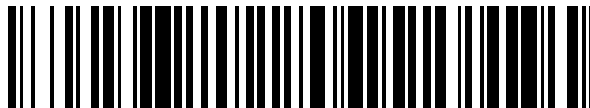


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 850**

51 Int. Cl.:

C12N 7/04 (2006.01)

C12N 15/869 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2011 PCT/EP2011/001712**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2011 WO11124371**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2011 E 11713689 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2556150**

54 Título: **Partícula viral liberada después de la infección de células de mamífero por citomegalovirus humano (HCMV) que contiene una proteína de fusión y uso de la misma**

30 Prioridad:

06.04.2010 EP 10003712

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

16.02.2017

73 Titular/es:

**VAKZINE PROJEKT MANAGEMENT GMBH
(100.0%)**

**Mellendorfer Str. 9
30625 Hannover, DE**

72 Inventor/es:

**BECKE, SABINE;
REYDA, SABINE y
PLACHTER, BODO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 601 850 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

Partícula viral liberada después de la infección de células de mamífero por citomegalovirus humano (HCMV) que contiene una proteína de fusión y uso de la misma

5 La presente invención se refiere a una partícula viral liberada después de la infección de células de mamífero por citomegalovirus humano (HCMV), donde

- a) la partícula está rodeada por una membrana lipídica en la que están enclavadas las glicoproteínas virales,
- b) la partícula no contiene ni DNA viral ni cápsides; y
- c) la partícula contiene una proteína de fusión que comprende una o más partes del antígeno pp65 de células T y al menos un péptido heterólogo;

10 a la partícula viral para el uso en un método para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad y al uso de dicha partícula viral o de una pluralidad de dichas partículas virales.

15 La infección con el citomegalovirus humano (HCMV) es una causa importante de enfermedad en pacientes después del trasplante de órganos sólidos o de células madre hematopoyéticas [1-9]. Además, la transmisión del virus durante el embarazo es una de las causas más frecuentes de secuelas duraderas en el recién nacido en el hemisferio occidental [10;11]. El desarrollo de una vacuna frente a HCMV ha sido, por tanto, identificado como un objetivo de alta prioridad [12].

20 Un objetivo de dicha vacuna sería prevenir la infección en la madre o, al menos, la transmisión a través de la placenta. La inducción de anticuerpos neutralizantes se considera esencial para lograr esto. En contraste, se considera que las respuestas celulares, particularmente mediadas por las células T CD8, proporcionan protección contra la reactivación y el control de la infección en los receptores de trasplantes [13-15]. Para mejorar las consecuencias de la reactivación viral de HCMV en el periodo post-trasplante, sería deseable la vacunación terapéutica de los receptores de trasplantes, que se dirige a la respuesta de los linfocitos, posiblemente combinada con la transferencia de células T adoptivas [16].

25 A pesar de los enfoques prometedores para el desarrollo de una vacuna contra el HCMV, no hay, sin embargo, todavía una formulación disponible con licencia [10;17-19]. De los numerosos estudios relacionados con los inmunofectores que permiten la protección, parece evidente que una vacuna ideal frente a HCMV induciría tanto anticuerpos neutralizantes antivirales como linfocitos T [10;17;18;38]. Hay, sin embargo, preocupación de si alguna vez podrá crearse una vacuna tan universal contra el HCMV . Un estudio clínico reciente mostró que los replicones del alfavirus que expresan proteínas de HCMV eran bien tolerados e inducían respuestas celulares y humorales sostenidas [19]. Otro estudio empleó gB purificado como vacuna y proporcionó resultados alentadores, ya que podían inducirse niveles significativos de anticuerpos neutralizantes de HCMV [18]. Estas vacunas son prometedoras para ser utilizadas para la prevención de la infección congénita por HCMV.

35 En estudios previos en ratones, los llamados cuerpos densos, que también se denominan en la presente memoria como DB, demostraron ser sorprendentemente inmunogénicos [20]. Tal como se entiende generalmente en la técnica y también como se usa en este documento un cuerpo denso es una partícula viral liberada después de la infección de las células de mamífero por citomegalovirus humano (HCMV), donde

- a) la partícula está rodeada por una membrana lipídica en la que están enclavadas las glicoproteínas virales,
- b) la partícula no contiene ni DNA viral ni cápsides.

40 Preferiblemente dicho cuerpo denso también contiene una proteína de fusión que comprende una o más partes del antígeno pp65 de las células T y al menos un péptido heterólogo. Los cuerpos densos y su preparación están también descritos en el documento de solicitud de patente internacional WO 00/53729.

45 En vista de su sorprendente inmunogenicidad, se hicieron esfuerzos para desarrollar DB como una vacuna contra HCMV. Experimentos recientes han demostrado que es posible modificar el contenido antigénico del los DB [21;22]. Esto se logró mediante la expresión de una proteína de fusión que consiste en el componente mayoritario del DB pp65 y un péptido heterólogo de la proteína viral IE1 presentado por moléculas MHC de clase I en HCMV recombinante. Esto dio como resultado la formación de un DB recombinante (recDB) en fibroblastos prepucciales humanos infectados (HFF). Los recDB que contienen la proteína de fusión se liberaron de los HFF infectados [21]. La aplicación de estas partículas a ratones HHD transgénicos para HLA-A2 indujo la respuesta de los linfocitos T CD8+, que fueron detectados tras la estimulación con el péptido in vitro de células T aisladas [22]. Sin embargo, 50 células T específicas de HCMV no pudieron ser inmediatamente detectadas cuando las fracciones de células T CD8+ se analizaron directamente ex-vivo con el análisis Elispot. Esto indicó que, aun siendo en principio adecuadas para aplicación terapéutica, el cebado no fue tan prominente como se deseaba con estas partículas. Además de eso, el rendimiento de estos recDB de los cultivos de HFF infectados fue bajo.

Por tanto, el problema fundamental de la presente invención fue proporcionar un cuerpo denso viral que es adecuado como vacuna, donde el cuerpo denso viral contiene una proteína de fusión que comprende una o más partes del antígeno pp65 de células T y al menos un péptido heterólogo y donde preferiblemente la vacuna es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria a al menos un péptido heterólogo.

5 Un problema adicional subyacente de la presente invención fue proporcionar un cuerpo denso viral, donde el cuerpo denso viral contiene una proteína de fusión que comprende una o más partes del antígeno pp65 de las células T y al menos un péptido heterólogo y donde preferiblemente el cuerpo denso es capaz de inducir la formación de anticuerpos neutralizantes y/o una respuesta de los linfocitos T CD8+.

10 Otro problema adicional subyacente de la presente invención fue proporcionar un cuerpo denso viral, donde el cuerpo denso viral contiene una proteína de fusión que comprende una o más partes del antígeno pp65 de las células T y al menos un péptido heterólogo y donde el cuerpo denso se puede preparar con elevados rendimientos.

Estos y otros problemas son resueltos por la materia objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas. Pueden extraerse realizaciones preferidas a partir de las reivindicaciones dependientes también adjuntas.

15 Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un primer aspecto, que es también la primera realización del primer aspecto, por una partícula viral liberada después de la infección de las células de mamífero por el citomegalovirus humano (HCMV), donde la partícula viral es un cuerpo denso, donde

a) la partícula está rodeada por una membrana lipídica en la que las glicoproteínas virales están enclavadas,

b) la partícula no contiene ni DNA viral ni cápsides; y

20 c) la partícula contiene una proteína de fusión que comprende una o más partes del antígeno pp65 de las células T y al menos un péptido heterólogo antigénico,

y donde el al menos un péptido heterólogo está insertado en la posición del aminoácido W175 o A535 de la secuencia de aminoácidos del antígeno pp65 de las células T de SEQ ID NO: 1.

25 En una segunda realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera realización del primer aspecto, al menos un péptido heterólogo antigénico está insertado en la posición W175 del aminoácido de la secuencia de aminoácidos del antígeno pp65 de las células T.

En una tercera realización del primer aspecto que es también una realización de la primera y la segunda realización del primer aspecto, la secuencia de aminoácidos del antígeno pp65 de las células T comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

30 En una cuarta realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, la segunda y la tercera realización del primer aspecto, la partícula es altamente antigénica.

En una quinta realización del primer aspecto que es también una realización de la primera, la segunda, la tercera y la cuarta realización del primer aspecto, la partícula es capaz de inducir la formación de anticuerpos neutralizantes.

35 En una sexta realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta y la quinta realización del primer aspecto, la partícula es capaz de inducir una respuesta de los linfocitos T CD8⁺.

En una séptima realización del primer aspecto que es también una realización de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta y la sexta realización del primer aspecto, el al menos un péptido heterólogo antigénico es un antígeno presentado por el MHC de clase I.

40 En una octava realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta, la sexta y la séptima realización del primer aspecto, el al menos un péptido heterólogo antigénico comprende o está formado de una o más partes de una o más proteínas que es o son diferentes del pp65.

En una novena realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta, la sexta, la séptima y la octava realización del primer aspecto, el al menos un péptido heterólogo antigénico comprende o es una o más partes de una glicoproteína del HCMV.

45 En una décima realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta, la sexta, la séptima, la octava y la novena realización del primer aspecto, el al menos un péptido heterólogo antigénico comprende o es una o más partes de la glicoproteína gB del HCMV.

50 En una undécima realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta, la sexta, la séptima, la octava y la novena realización del primer aspecto, el al menos un péptido heterólogo antigénico comprende o es una o más partes de la glicoproteína gH del HCMV.

- En una duodécima realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta, la sexta, la séptima, la octava y la novena realización del primer aspecto, el al menos un péptido heterólogo antigénico comprende o consiste en al menos dos glicoproteínas del HCMV que son variantes de una glicoproteína en particular de diferentes cepas de HCMV.
- 5 En una decimotercera realización del primer aspecto, que es también una realización de la duodécima realización del primer aspecto, una al menos de las dos variantes de la glicoproteína en particular es la variante de la cepa Towne del HCMV y la otra de las al menos dos variantes de la glicoproteína en particular es la variante de la cepa Ad169 del HCMV.
- 10 En una decimocuarta realización del primer aspecto, que es también una realización de la duodécima y la decimotercera realización del primer aspecto, la glicoproteína es la proteína gB del HCMV.
- En una decimoquinta realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta, la sexta, la séptima y la octava realización del primer aspecto, el al menos un péptido heterólogo antigénico comprende o es una o más partes de la proteína IE1 del HCMV.
- 15 En una décimosexta realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta, la sexta, la séptima y la octava realización del primer aspecto, el al menos un péptido heterólogo antigénico comprende o es una o más partes de una glicoproteína del HCMV y una o más partes de la proteína IE1 del HCMV.
- 20 En una decimoséptima realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta, la sexta, la séptima y la octava realización del primer aspecto, el al menos un péptido heterólogo antigénico es una o más partes de una proteína que es parte de un patógeno humano distinto del HCMV.
- En una decimoctava realización del primer aspecto, que es también una realización de la decimoséptima realización del primer aspecto, la proteína que es parte de un patógeno humano distinto del HCMV, es una proteína frente a la cual se forman linfocitos T citotóxicos en seres humanos tras la infección natural de seres humanos con el patógeno humano distinto del HCMV.
- 25 En una decimonovena realización del primer aspecto, que es también una realización de la decimoctava realización del primer aspecto, el patógeno humano distinto del HCMV es un patógeno humano seleccionado del grupo que comprende el HIV-1, HBV, HCV y el virus de la gripe.
- 30 En una vigésima realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta, la sexta, la séptima, la octava, la novena, la décima, la undécima, la duodécima, la decimotercera, la decimocuarta, la decimoquinta, la decimosexta, la decimoséptima, la decimoctava y la decimonovena realización del primer aspecto, la proteína de fusión es una proteína de fusión que comprende un antígeno pp65 de longitud completa de células T y al menos un péptido heterólogo antigénico.
- 35 En una vigesimoprimera realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta, la sexta, la séptima, la octava, la novena, la décima, la undécima, la duodécima, la decimotercera, la decimocuarta, la decimoquinta, la decimosexta, la decimoséptima, la decimoctava, la decimonovena y la vigésima realización del primer aspecto, la partícula viral, o un pluralidad de dicha partícula, es para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.
- 40 En una vigesimosegunda realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta, la sexta, la séptima, la octava, la novena, la décima, la undécima, la duodécima, la decimotercera, la decimocuarta, la decimoquinta, la decimosexta, la decimoséptima, la decimoctava, la decimonovena y la vigésima realización del primer aspecto, la partícula viral, o una pluralidad de dicha partícula, es para la utilización en un método para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.
- 45 En una vigesimotercera realización del primer aspecto, que es también una realización de la vigesimoprimera y la vigesimosegunda realización del primer aspecto, la enfermedad es una enfermedad que puede ser tratada y/o prevenida mediante la formación de anticuerpos neutralizantes frente el al menos un péptido heterólogo antigénico o un derivado del mismo, o mediante la inducción de una respuesta de los linfocitos T CD8⁺ frente al al menos un péptido heterólogo antigénico o un derivado del mismo.
- 50 En una vigesimocuarta realización del primer aspecto, que es también una realización de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta, la sexta, la séptima, la octava, la novena, la décima, la undécima, la duodécima, la decimotercera, la decimocuarta, la decimoquinta, la decimosexta, la decimoséptima, la decimoctava, la decimonovena y la vigésima realización del primer aspecto, la partícula viral, o un pluralidad de dicha partícula, es para la fabricación de una vacuna.
- En una vigesimoquinta realización del primer aspecto, que es también una realización de la vigesimocuarta realización del primer aspecto, la vacuna es para el tratamiento y/o prevención de la infección por HCMV.

En una vigesimosexta realización del primer aspecto, que es también una realización de la vigesimocuarta realización del primer aspecto, la vacuna es para el tratamiento y/o prevención de los efectos secundarios de un trasplante.

5 En una vigesimoséptima realización del primer aspecto, que es también una realización de la vigesimosexta realización del primer aspecto, el trasplante es el trasplante de un órgano sólido o de células madre hematopoyéticas.

En una vigesimooctava realización del primer aspecto, que es también una realización de la vigesimosexta y vigesimoséptima realización del primer aspecto, el efecto secundario es causado por o se acompaña de una infección por HCMV.

10 El problema fundamental de la presente invención se resuelve en un segundo aspecto que es también la primera realización del segundo aspecto, mediante el uso de una partícula viral de acuerdo con cualquiera de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta, la sexta, la séptima, la octava, la novena, la décima, la undécima, la duodécima, la decimotercera, la decimocuarta, la decimoquinta, la decimosexta, la decimoséptima, la decimooctava, la decimonovena y la vigésima realización del primer aspecto para la fabricación de un medicamento para el
15 tratamiento y/o prevención de una enfermedad o efectos secundarios, en donde la enfermedad o los efectos secundarios es una enfermedad o son unos efectos secundarios como se define en cada una y cualquiera de las realizaciones precedentes y en cada uno y cualquier aspecto.

20 El problema fundamental de la presente invención se resuelve en un tercer aspecto que es también la primera realización del tercer aspecto, mediante el uso de una partícula viral de acuerdo con cualquiera de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta, la sexta, la séptima, la octava, la novena, la décima, la undécima, la duodécima, la decimotercera, la decimocuarta, la decimoquinta, la decimosexta, la decimoséptima, la decimooctava, la decimonovena y la vigésima realización del primer aspecto para la fabricación de una vacuna para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o efectos secundarios, en donde la enfermedad o los efectos secundarios es una
25 enfermedad o son unos efectos secundarios como se define en cada una y cualquiera de las realizaciones precedentes y en cada uno y cualquier aspecto.

Basándose en la idea de que el sitio de inserción para secuencias de péptidos heterólogos en pp65 era crítico para la eficiencia de la subsiguiente formación de DB, los presentes inventores han encontrado asombrosamente que la proteína de fusión que está contenida en las partículas virales de la invención y que comprende una o más partes del antígeno pp65 de las células T y al menos un péptido heterólogo, confiere características ventajosas a los DB si
30 el péptido heterólogo está insertado en la posición de aminoácido W175 o en la posición de aminoácido A 534 de la secuencia de aminoácidos en pp65. Las características ventajosas de estas proteínas de fusión comprenden la inducción de los anticuerpos neutralizantes frente al péptido heterólogo, la inducción de una respuesta de los linfocitos T CD8⁺ frente al péptido heterólogo y la producción de dichos DB con un alto rendimiento. Por otra parte, estos dos loci en pp65 permitieron la formación y la liberación eficiente de los DB que contienen dichas proteínas de fusión. La respuesta de los linfocitos T CD8⁺ observada para estas dos proteínas de fusión cebaron las respuestas de las células T CD8⁺, que son fácilmente detectables mediante el análisis Elispot in vivo de fracciones de células T CD8.
35

40 El antígeno pp65 de las células T, que también está referido en la técnica como UL 83, ha sido descrito por Pande, H. y colaboradores (Pande, H, Lee, T.D., Churchill, M.A. and Zaia, J.A, "Structural analysis of a 64-kDa major structural protein of human cytomegalovirus (Towne): identification of a phosphorylation site and comparison to pp65 of HCMV (AD169); Virology 178 (1), 6-14 (1990)).

Poco se sabe sobre la función del pp65 y sobre los dominios, importantes para la función y correcto plegamiento de la proteína. En consecuencia, no hay ninguna razón para la selección del sitio de inserción que definitivamente ahorraría regiones funcionalmente relevantes dentro del pp65. La selección del sitio de inserción se llevó a cabo
45 evitando las regiones conservadas en los virus del herpes beta y también en estructuras secundarias predichas (hélices α y hojas β). Esto se hizo asumiendo que las regiones conservadas, hélices α y hojas β podían ser estructuralmente y funcionalmente importantes y no serían destruidas. Sin embargo, la mayoría de estos mutantes no pudieron formar eficientemente recDB, lo que indica que esta estrategia no podía identificar sitios de inserción adecuados. A la luz de los mismos los presentes inventores encontraron sorprendentemente que los sitios de
50 inserción en RV-SB3 y RV-SB6 demostraban ser más apropiados para la formación de recDB.

Como se muestra en la presente solicitud, la introducción exógena en el pp65 quimérico por DB-SB3 y DB-SB6 en HFF conduce a una eficiente presentación de pp65NLV y IE1TMY. La aplicación de estas partículas a ratones HHD transgénicos HLA-A2 cebó una respuesta de las células T CD8 frente a ambos péptidos que podía ser detectada después de la expansión in Vitro de estas células T con el péptido afín. También se han obtenido resultados
55 similares en experimentos previos, usando recDB con inserción del péptido IE1 en la posición 548 del pp65 [21;22]. Sin embargo, usando este último recDB, las células T CD8 frente el péptido fueron indetectables directamente ex vivo, lo que significa que el cebado fue ineficiente. La aplicación de DB-SB3, en contraste, condujo a frecuencias fácilmente detectables de pp65NLV específico y IE1TMY específico de células T CD8. Esto indica que estos recDB eran altamente inmunogénicos e inducían a las células T frente a ambos péptidos endógenos y heterólogos.

En una realización de la presente invención el péptido heterólogo es un péptido antigénico y más preferiblemente un péptido heterólogo antigénico.

En una realización de la presente invención el péptido heterólogo es diferente de la proteína IE1 del HCMV o una parte de éste.

- 5 En una realización de la presente invención la longitud de un péptido es de aproximadamente 4 a 40 restos de aminoácidos, preferiblemente aproximadamente de 6 a 25 restos de aminoácidos y más preferiblemente aproximadamente de 8 a 15 restos de aminoácidos y lo más preferible aproximadamente de 8 a 12 restos de aminoácidos.

- 10 Tal como se utiliza preferiblemente, cualquier término que especifica los límites de un intervalo como, por ejemplo, "de 1 a 5" significa cualquier número entero de 1 a 5, es decir 1, 2, 3, 4 y 5. En otras palabras, cualquier intervalo que esté definido por dos números enteros comprende ambos de los dos números enteros que definen dichos límites de la definición y cualquier número entero comprendido en o contenido dentro de dicho intervalo.

- 15 En una realización de la presente invención la antigenicidad de la partícula viral de la invención está incrementada en comparación con la de los cuerpos densos de la técnica anterior, más específicamente aquellos cuerpos densos en los que el cuerpo denso contiene una proteína de fusión que comprende el antígeno pp65 de longitud completa de las células T.

En una realización de la presente invención la formación de la partícula viral de la invención se incrementa en comparación con la formación de los cuerpos densos tal y como se describe en [25].

- 20 Será reconocido por un experto en la técnica que, preferiblemente, la proteína IE1 del HCMV también se conoce como ppUL123.

También será reconocido que la proteína de fusión contenida en la partícula es, en una realización preferida, una proteína quimérica.

La presente invención se ilustra ahora en más detalle por referencia a las siguientes figuras y ejemplos a partir de los cuales pueden extraerse otras ventajas, características, y realizaciones, donde

- 25 Fig. 1 muestra el resultado de un análisis de inmunofluorescencia indirecto de HFF infectados con HCMV recombinantes;

Fig. 2 muestra el resultado de un análisis de inmunotransferencia (A), el resultado de un análisis cuantitativo DNA-PCR como un diagrama que indica las copias de genoma/ml como una función de tiempo (d.p.i) para diferentes proteínas de fusión (B), y el resultado de un análisis de inmunotransferencia adicional (C);

- 30 Fig. 3 muestra el resultado de un análisis IFN- γ -Elispot como un diagrama que indica el porcentaje de respuesta de células CD8⁺ para diferentes proteínas de fusión ya sea utilizando pp65NLV-CTL (A) o IE1TMY-CTL (B) como células de respuesta;

Fig. 4 muestra el resultado de un análisis IFN- γ -Elispot como un diagrama que indica el porcentaje de respuesta de células CD8⁺ para diferentes proteínas de fusión usando células RMA-S como células estimuladoras; y

- 35 Fig. 5 muestra la secuencia de aminoácidos del pp65 de longitud completa (SEQ ID NO:1)

- 40 Fig. 1 muestra el resultado de un análisis de inmunofluorescencia indirecto de HFF, infectados con HCMV recombinantes. Las células fueron infectadas con los virus indicados durante cuatro días y fueron después procesadas mediante el análisis de inmunofluorescencia. La configuración del recombinante pp65, expresada para cada virus está indicada debajo de los micrográficos. El aminoácido N-terminal del pp65, que linda con el sitio de inserción está marcado.

- 45 Fig. 2 muestra la expresión de las proteínas de fusión-pp65, replicación de los virus recombinantes y la eficiencia de empaquetado de las proteínas de fusión en viriones y DB. (A), Análisis por inmunotransferencia de los HFF infectados a 2- y 4- días. Las células fueron infectadas a un m.o.i de 2 y fueron recogidas a los tiempos indicados para el análisis. Los filtros fueron probados con anticuerpo monoclonal específico de pp65 65-33. Las cantidades de proteínas en cada canal fueron normalizadas frente a la β -actina. (B), Análisis cuantitativo DNA-PCR de genomas víricos en el sobrenadante del cultivo celular de los HFF infectados. Las células fueron infectadas a un m.o.i. de 10 genomas/célula. Los sobrenadantes del cultivo fueron recogidos en los puntos de tiempo indicados y congelados. El análisis PCR fue realizado en paralelo en el mismo ensayo. (C), Análisis de inmunotransferencia del pp65, empaquetado en recDB o viriones. Las células fueron infectadas con los virus recombinantes o con wt RV-HB5
50 durante 6-7 días. Los sobrenadantes fueron sometidos a una centrifugación con un gradiente glicerol-tartrato para recogidas estándar, usando un anticuerpo monoclonal frente al gB viral.

La figura 3 muestra el resultado de un análisis IFN- γ -Elispot de la presentación de MHC de clase I por HFF positivos para HLA-A2, tratadas con recDB. Las células fueron tratadas con los indicados DB y fueron después utilizadas

como células estimuladoras en el análisis IFN- γ -Elispot, utilizando o pp65NLV-CTL (A) o IE1TMY-CTL (B) como células de respuesta.

La fig. 4 muestra el resultado de un análisis IFN- γ -Elispot *ex vivo* de células CD8⁺ enriquecidas del bazo de ratones HHD, inmunizados con recDB. Células RMA-S, cargadas con los péptidos afines se tomaron como células estimuladoras. El tamaño de las barras representa las frecuencias más probables de IFN- γ que secretan las células T CD8, como se determina por el análisis de regresión lineal, descrito por Böhm y colaboradores [37]. Las barras de error indican intervalos de confianza del 95%.

Ejemplo 1: Materiales y Métodos

1. Células

Los fibroblastos de prepucio humano primarios, líneas CTL y células T2 fueron cultivadas como se describió anteriormente [23]. Las células RMA-S [24] fueron cultivadas en un medio RPMI 1640 (laboratorios PAA, Cölbe, Alemania) enriquecido con un 10% de FCS, glutamina 2mM, 50 mg de gentamicina L-1 y β -mercaptoetanol 5 μ M.

2. Plásmidos y virus

Para la mutagénesis del DNA viral, se utilizó el cromosoma artificial bacteriano (BAC) pHB5 del HCMV [25]. La mutagénesis del pHB5 se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento de selección positiva/negativa para galK [26] como se describe en otra parte [21]. La secuencia de DNA insertada en el marco de lectura abierto de UL83 codificó el péptido IE1TMY presentado por HLA-A2 [IE1297-305], flanqueado por aminoácidos adicionales que permiten el correcto procesamiento por el proteosoma. El polipéptido adicional fusionado con pp65 contiene la secuencia TSDACMMTMYGGISLLSEFC, donde el nonapéptido presentado por HLA-A2 aparece subrayado. La reconstitución viral de los clones BAC se llevó a cabo de acuerdo con Hobom y colaboradores [27].

Se generaron, titularon y cuantificaron reservas de virus, bien por recuento de células positivas para IE1 a las 48 horas tras la infección, o por análisis PCR DNA TaqMan de genomas virales extracelulares como está descrito [28]. Los HFF fueron infectados durante 7 días. La infección a un moi (multiplicidad de infección, por sus siglas en inglés) de 0,1 dio como resultado un número de aproximadamente 10 genomas virales intracelulares.

3. Purificación de cuerpos densos, análisis de inmunofluorescencia indirecta e inmunotransferencia

Los DB fueron purificados de los HFF infectados en el último estadio mediante ultracentrifugación con un gradiente glicerol-tartrato como fue publicado originalmente por Irmieri y Gibson [29] y descrito previamente [20]. El análisis de inmunofluorescencia indirecta se llevó a cabo como se describe en [30]. El pp65 se marcó usando el anticuerpo monoclonal 65-33 (proporcionado amablemente por W. Britt, Universidad de Alabama, Birmingham, Alabama, USA) y anticuerpos secundarios conjugados con FITC (Dako, Hamburg, Alemania). El núcleo fue teñido con colorante de contraste DAPI. Los datos de los análisis de inmunofluorescencia se recogieron usando un microscopio Axiophot-1 (Zeiss) a 1000 aumentos. Para la inmunotransferencia, las muestras de proteínas se desnaturalizaron bajo condiciones reductoras, se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Schwalbach, Alemania) por electrotransferencia a 400 mA durante 1 h 45 min. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos frente a pp65, β -actina (Rockland, Gilbertsville, PA, USA) y glicoproteína B (gB) [31]). Las transferencias Western se probaron con anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo, conjugados con ALEXA Fluor 680 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) o IRdye 800 (Rockland). Las proteínas transferidas se detectaron y cuantificaron utilizando un sistema de imagen de infrarrojo Odyssey (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA).

2.4 Ensayo interferón γ - Elispot de HFF incubados con recDB

Se realizaron ensayos inmunoabsorbentes vinculados a enzimas (Elispot) fueron realizados como se describió anteriormente [23;32]. En estos análisis, se usaron líneas CTL específicas para péptidos derivados de HCMV y restringidos en HLA-A0201 (A2) pp65495-503 (pp65NLV-CTL) [33;34] e IE11297-305 (IE1TMY-CTL) [35]. Las líneas CTL se habían generado inmunizando ratones doblemente transgénicos (tg) HLA-A2/huCD8 [23].

2.5 Modelo de ratón transgénico para HLA-A2

Se inmunizaron ratones transgénicos para HLA-A2 de 8-12 semanas de vida (ratones HHD, [36]) por vía intraperitoneal con 6 μ g de DB de RV-HB5 (DB-HB5), de RV-SB3 (DB-SB3) o de RV-SB6 (DB-SB6), respectivamente, o con PBS. Se prepararon linfocitos a partir de los bazos el día 7 después de la inmunización. Se enriquecieron células T CD8 por separación selectiva MACS y se analizó la frecuencia de las células secretoras de IFN- γ mediante Elispot directamente *ex vivo*, utilizando células estimulantes T2 o RMA-S HHD. En esta configuración se usaron las placas de Elispot de Millipore (Schwalbach/Ts., Alemania). El ensayo de Elispot se llevó a cabo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las frecuencias de las células de respuesta fueron determinadas por análisis de regresión lineal como describieron Böhr y colaboradores [37].

Ejemplo 2: La inserción en el sitio seleccionado es crítico para la formación de DB citoplásmicos

Como se ilustrará en este ejemplo, la selección del sitio de inserción del péptido heterólogo es crítica para la formación de DB citoplásmicos.

5 El potencial de un candidato a vacuna para ser desarrollado después depende de manera crítica del rendimiento que se pueda lograr para un escalado posterior. En trabajos anteriores, se pudieron aportar evidencias de que los DB podían ser modificados en sus contenidos antigénicos por fusión de una secuencia peptídica heteróloga a la proteína del tegumento pp65 [21]. Sin embargo, las células infectadas con el recombinante respectivo del HCMV liberaron sólo cantidades limitadas de recDB. Por tanto se ensayó la hipótesis de que la inserción de una secuencia heteróloga tal como la secuencia de aminoácidos de un péptido heterólogo en otros sitios dentro de pp65 mejoraría el rendimiento del recDB.

10 Se seleccionaron cinco sitios en diferentes partes de la molécula para la inserción (Fig. 1). El péptido insertado consistía en 20 aminoácidos que abarcaban el nonapéptido TMYGGISLL (IE1TMY) de la proteína HCMV IE1, que presentaba HLA-A2 [35]. Los virus recombinantes se generaron modificando el plásmido pHB5 de HCMV BAC, usando el procedimiento de selección basado en GalK [21;22]. Los plásmidos-BAC recombinantes fueron analizados en cuanto a exactitud por digestión con endonucleasas de restricción y secuenciación nucleotídica del sitio de inserción (datos no mostrados). La reconstitución de los virus recombinantes se realizó después por transfección de los plásmidos-BAC en HFF. Los virus resultantes fueron probados para la formación de DB. Un sello distintivo de la infección de los HFF por HCMV es la acumulación citoplásmica de DB, que puede ser visualizada por análisis de inmunofluorescencia indirecta (IFA). En consecuencia, los HFF fueron infectados con mutantes recién generados y el análisis IFA fue realizado a los 4 días después de la infección (d.p.i.), usando un anticuerpo pp65-específico (Fig. 1). Sólo las células infectadas con los mutantes RV-SB3 y RV-SB6 mostraron la formación de DB citoplásmico de una manera comparable a la formación de DB en células infectadas por el virus parental. En contraste, ninguna o muy poca formación de DB se observó en células infectadas con RV-SB2, RV-SB4, y RV-SB5. Hay que tener en cuenta que en estas células, se veía afectada la translocalización núcleo-citoplasma de pp65, que normalmente se ve en la etapa tardía de los HFF infectados. Estos resultados indicaron que la selección del sitio para la inserción de las secuencias del péptido heterólogo dentro del pp65 era crítico para la formación de recDB. En base a los resultados IFA los virus RV-SB3 y RV-SB6 se eligieron para análisis posteriores.

Ejemplo 3: Comparación del RV-SB3 y RV-SB6 con la cepa parental

30 Como se mostrará en este ejemplo, los virus recombinantes RV-SB3 y RV-SB6 son comparables a la cepa parental con respecto a la expresión del pp65, la liberación del virión y el empaquetado del pp65 en partículas.

35 Los niveles de expresión del pp65 en HFF infectados con RV-SB3 y RV-SB6 fueron ensayados por análisis de inmunotransferencia. Las células se infectaron con cualquiera de los virus o con RVHB5 parental durante dos o cuatro días, respectivamente. Las células lisadas fueron sometidas al análisis de inmunotransferencia cuantitativo, utilizando el sistema de imagen por infrarrojo Odyssey. La cantidad de actina celular se tomó como patrón interno (Fig. 2A). Los niveles de expresión de las proteínas de fusión-pp65 en células infectadas con RV-SB3 y RV-SB6 disminuyeron a los dos días después de la infección comparados con los niveles de pp65 en células infectadas con RV-HB5 parental. Sin embargo, a los cuatro días después de la infección, los niveles de las dos proteínas de fusión parecieron ser incluso más altos que el del pp65 en células infectadas con RV-HB5. Esto indicaba que se sintetizó una cantidad suficiente de proteína en las células infectadas con RV-SB3 y RV-SB6 para dirigir la síntesis de recDB.

40 Para ensayar la capacidad de las cepas recombinantes para replicarse en HFF, las células se infectaron a un m.o.i. de 0,1, dando como resultado 10 copias de genoma/célula y el sobrenadante del cultivo se recogió a intervalos diarios hasta 7 días después de la infección. El DNA viral liberado en el sobrenadante se cuantificó utilizando un análisis PCR cuantitativo (Fig. 2B). Ambos RV-SB3 y RV-SB6 demostraron replicarse a niveles similares que el RV-HB5 parental.

45 El empaquetado de las proteínas de fusión se analizó finalmente por análisis de inmunotransferencia de viriones purificados y DB, recogidos de los sobrenadantes de los HFF infectados por centrifugación en gradiente de glicerol. En este caso, la normalización fue llevada a cabo usando la envoltura viral de la glicoproteína B (gB) como patrón interno. No se encontraron diferencias en el empaquetado del pp65 en viriones o DBs cuando se compararon las cepas recombinantes con sus cepas parentales (Fig. 2C). Tomados en conjunto estos resultados indicaron que RV-SB3 y RV-SB6 eran comparables con RV-HB5 en la expresión y empaquetado del pp65 y en la replicación en las células infectadas.

Ejemplo 4: Expresión de ambos pp65NLV y IE1TMY por HFF tratados con DB-SB3 o DB-SB6.

El presente ejemplo muestra que tanto pp65NLV como IE1TMY son presentados por HFF tratados con DB-SB3 o DB-SB6.

55 Un objetivo del uso de recDB para el desarrollo de vacunas sería ayudar a la reconstitución de las células T citotóxicas en pacientes después de un trasplante. Estas células han mostrado ser de crítica importancia para la prevención de la reactivación del virus y la enfermedad ([13;15] resumido en [16]). Por tanto se ensayó si los recDB

eran capaces de introducir tanto el pp65NLV derivado del pp65 como el IE1TMY derivado del IE1 en la ruta de presentación de MHC de clase I de los HFF.

De acuerdo con esto, las células se trataron con recDB y se sometieron a continuación al análisis de interferón- γ -Elispot (Fig. 3). Como células de respuesta, se usaron clones CTL frente a ambos péptidos (pp65NLV-CTL; IE1TMY-CTL) [23]. Tanto las células tratadas con DB-SB3 como con DB-SB6 presentaron IE1-TMY y pp65NLV. La presentación del pp65NLV era comparable con la de recDB y wt-DB, lo que indica que la inserción de la secuencia derivada de IE1 no afectó a la presentación de pp65 en HFF. El tratamiento de las células con DB-SB3 condujo a valores de respuesta de IE1TMY-CTL a niveles comparables a los de la respuesta específica del pp65. Sin embargo, el tratamiento de las células con DB-SB6 condujo a un número notablemente reducido de puntos positivos en el ensayo específico de IE1. Esto indicaba que la capacidad de los HFF para presentar el péptido IE1 después de la incubación con DB era sensible al lugar, donde el péptido fuese insertado en pp65.

Ejemplo 5: La inmunización con DB recombinantes (recDB) da como resultado células T CD8 específicas para IE1TMY y específicas para pp65NLV .

Este ejemplo muestra que la inmunización con DB recombinante (recDB) ceba frecuencias significativas en células T CD8 específicas para IE1TMY y específicas para pp65NLV .

Experimentos previos habían mostrado que recDB podía inducir células T CD8 específicas para IE1TMY en ratones. Sin embargo, estas células eran detectables sólo después de una estimulación in vitro de fracciones de células T CD8 de ratones inmunizados con el péptido afín. Se detectaron células T CD8 sin respuesta directamente ex vivo, indicando que el número total de células específicas, y por tanto la respuesta general a esos recDB fue baja [21]. Para evaluar el potencial inmunológico del recDB recién establecido, los ratones transgénicos HLA-A2 se inmunizaron con los diferentes DB en ausencia de coadyuvante. Como era de esperar, las células T CD8 de respuesta específicas para IE1TMY y pp65NLV fueron detectables después de la estimulación in vitro (datos no mostrados).

Las células de ratones inmunizados también se ensayaron directamente ex vivo. Para esto, las fracciones CD8⁺ de células de bazo se separaron por separación selectiva MACS y se ensayaron por análisis Elispot, usando células que presentan un antígeno en el péptido cargado. Las células T CD8 específicas para IE1TMY podían ser detectadas después de la inmunización tanto con DB-SB3 como DB-SB6 (Fig. 4). La respuesta específica para IE1 cebada por DB-SB3 pareció ser más fuerte que la respuesta inducida por DB-SB6, pero ambas alcanzaron claramente niveles detectables.

Después de la inmunización con DB-SB3, las células T CD8 reactivas frente al pp65NLV pudieron ser detectadas a un nivel aproximadamente triple, comparado con wt-DB.

Sorprendentemente, sin embargo, esta respuesta fue indetectable en el conjunto de experimentos elegidos después de la inmunización con DB-SB6 y la respuesta del pp65NLV específico no pudo ser detectada ex vivo. Este resultado fue confirmado en un segundo experimento e indicó que la respuesta de las células T CD8, cebadas frente al péptido inmunodominante pp65NLV por inmunización con DB-SB6 fue ineficiente. (Fig. 4). Se obtuvieron resultados comparables cuando se eligieron células T2 para la presentación del antígeno (datos no mostrados). Además, esto indica que estas células fueron inducidas en sólo bajas frecuencias por debajo del límite de detección del ensayo. De acuerdo con ello, la reestimulación de las células T específicas para pp65NLV in vitro se retrasó en comparación con las células específicas para IE1TMY (datos no mostrados).

Todos estos experimentos tomados en conjunto muestran particularmente el potencial del DB-SB3 para cebar una respuesta de las células T CD8 frente al péptido antigénico heterólogo.

Lista de referencias

En la presente solicitud se hace referencia a los siguientes artículos:

- [1] Mwintshi K, Brennan DC. Prevention and management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplantation. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; 5(2):295-304.
- [2] Rubin RH. The pathogenesis and clinical management of cytomegalovirus infection in the organ transplant recipient: the end of the 'silo hypothesis'. *Curr Opin Infect Dis* 2007; 20(4):399-407.
- [3] Arthurs SK, Eid AJ, Pedersen RA, Dierkhising RA, Kremers WK, Patel R, et al. Delayed-onset primary cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Liver Transpl* 2007; 13(12):1703-9.
- [4] Arthurs SK, Eid AJ, Pedersen RA, Kremers WK, Cosio FG, Patel R, et al. Delayed-onset primary cytomegalovirus disease and the risk of allograft failure and mortality after kidney transplantation. *Clin Infect Dis* 2008; 46(6):840-6.
- [5] Peggs KS. Cytomegalovirus following stem cell transplantation: from pharmacologic to immunologic therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2004; 2(4):559-73.

- [6] Hebart H, Einsele H. Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. *Hum Immunol* 2004; 65(5):432-6.
- [7] Ljungman P. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: viral status. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20(2):209-17.
- 5 [8] Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, Rubin R, Wingard JR, Zaia J. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003; 9(9):543-58.
- [9] Boeckh M, Nichols WG. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood* 2004; 103(6):2003-8.
- 10 [10] Plotkin SA. Cytomegalovirus vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, editors. *Vaccines*. 5 ed. Elsevier, 2008: p. 1147-54.
- [11] Cheeran MC, Lokensgard JR, Schleiss MR. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(1):99-126, Table.
- 15 [12] Stratton KR, Durch JS, Lawrence R.S. *Vaccines for the 21st Century. A Tool for Decisionmaking*. Washington, DC: National Academy Press, 2001.
- [13] Reddehase MJ, Mutter W, Münch K, Bühring HJ, Koszinowski UH. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J Virol* 1987; 61:3102-8.
- [14] Wills MR, Carmichael AJ, Sissons JG. Adaptive Cellular Immunity to Human Cytomegalovirus. In: Reddehase MJ, editor. *Cytomegalovirus: Molecular Biology and Immunology*. Caister Academic Press, Wymondham, Norfolk, U.K., 2006: p. 341-65.
- 20 [15] Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 1995; 333(16):1038-44.
- [16] Herr W, Plachter B. Cytomegalovirus and varicella-zoster virus vaccines in hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8(8):999-1021.
- 25 [17] Schleiss MR. Cytomegalovirus vaccine development. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 325:361-82.
- [18] Pass RF, Zhang C, Evans A, Simpson T, Andrews W, Huang ML, et al. Vaccine prevention of maternal cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* 2009; 360(12):1191-9.
- 30 [19] Bernstein DI, Reap EA, Katen K, Watson A, Smith K, Norberg P, et al. Randomized, double-blind, Phase 1 trial of an alphavirus replicon vaccine for cytomegalovirus in CMV seronegative adult volunteers. *Vaccine* 2009; 28(2):484-93.
- [20] Pepperl S, Münster J, Mach M, Harris JR, Plachter B. Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J Virol* 2000; 74(13):6132-46.
- 35 [21] Mersseman V, Besold K, Reddehase MJ, Wolfrum U, Strand D, Plachter B, et al. Exogenous introduction of an immunodominant peptide from the nonstructural IE1 protein of human cytomegalovirus into the MHC class I presentation pathway by recombinant dense bodies. *J Gen Virol* 2008; 89(Pt2):369-79.
- [22] Mersseman V, Bohm V, Holtappels R, Deegen P, Wolfrum U, Plachter B, et al. Refinement of strategies for the development of a human cytomegalovirus dense body vaccine. *Med Microbiol Immunol* 2008; 197(2):97-107.
- 40 [23] Besold K, Frankenberg N, Pepperl-Klindworth S, Kuball J, Theobald M, Hahn G, et al. Processing and MHC class I presentation of human cytomegalovirus pp65-derived peptides persist despite gpUS2-11-mediated immune evasion. *J Gen Virol* 2007; 88(Pt 5):1429-39.
- [24] Townsend A, Ohlen C, Bastin J, Ljunggren HG, Foster L, Karre K. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 1989; 340(6233):443-8.
- 45 [25] Borst EM, Hahn G, Koszinowski UH, Messerle M. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*: a new approach for construction of HCMV mutants. *J Virol* 1999; 73(10):8320-9.
- [26] Warming S, Costantino N, Court DL, Jenkins NA, Copeland NG. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(4):e36.

- [27] Hobom U, Brune W, Messerle M, Hahn G, Koszinowski UH. Fast screening procedures for random transposon libraries of cloned herpesvirus genomes: mutational analysis of human cytomegalovirus envelope glycoprotein genes. *J Virol* 2000; 74(17):7720-9.
- 5 [28] Besold K, Wills M, Plachter B. Immune evasion proteins gpUS2 and gpUS11 of human cytomegalovirus incompletely protect infected cells from CD8 T cell recognition. *Virology* 2009; 391(1):5-19.
- [29] Irmiere A, Gibson W. Isolation and characterization of a noninfectious virionlike particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* 1983; 130:118-33.
- 10 [30] Schmolke S, Drescher P, Jahn G, Plachter B. Nuclear targeting of the tegument protein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus: an unusual bipartite nuclear localization signal functions with other portions of the protein to mediate its efficient nuclear transport. *J Virol* 1995; 69:1071-8.
- [31] Utz U, Britt W, Vugler L, Mach M. Identification of a neutralizing epitope on glycoprotein gp58 of human cytomegalovirus. *J Virol* 1989; 63:1995-2001.
- [32] Frankenberg N, Pepperl-Klindworth S, Meyer RG, Plachter B. Identification of a conserved HLA-A2-restricted decapeptide from the IE1 protein (pUL123) of human cytomegalovirus. *Virology* 2002; 295(2):208-16.
- 15 [33] Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, Weekes MP, Plachter B, et al. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* 1996; 70:7569-79.
- [34] Diamond DJ, York J, Sun JY, Wright CL, Forman SJ. Development of a candidate HLA A*0201 restricted peptide-based vaccine against human cytomegalovirus infection. *Blood* 1997; 90(5): 1751-67.
- 20 [35] Gallez-Hawkins G, Villacres MC, Li X, Sanborn MC, Lomeli NA, Zaia JA. Use of transgenic HLA A*0201/Kb and HHD II mice to evaluate frequency of cytomegalovirus IE1-derived peptide usage in eliciting human CD8 cytokine response. *J Virol* 2003; 77(7):4457-62.
- 25 [36] Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Perarnau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med* 1997; 185(12):2043-51.
- [37] Böhm V, Simon CO, Podlech J, Seckert CK, Gendig D, Deegen P, et al. The immune evasion paradox: immunoevasins of murine cytomegalovirus enhance priming of CD8 T cells by preventing negative feedback regulation. *J Virol* 2008; 82(23):11637-50.
- 30 [38] Pepperl-Klindworth S, Plachter B. Current perspectives in vaccine development. In: Reddehase MJ, editor. *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology*. Caister Academic Press Ltd, Wymondham, Norfolk, U.K., 2006.

Las características de la presente invención reveladas en la memoria descriptiva, las reivindicaciones, la lista de secuencias y/o los dibujos pueden ser material para realizar la invención en diversas formas de la misma, tanto tomadas por separado como en cualquier combinación de las mismas,

Lista de secuencias

<110> Vakzine Projekt Management GmbH

<120> Partícula viral liberada después de la infección de células de mamífero por citomegalovirus humano (HCMV) que contiene una proteína de fusión y uso de la misma

5 <130> V 10025 PCT

<150> EP10003712.6

<151> 2010-04-06

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

10 <210> 1

<211> 561

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> sintética

<400> 1

Met Glu Ser Arg Gly Arg Arg Cys Pro Glu Met Ile Ser Val Leu Gly
1 5 10 15

Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys Ala Val Phe Ser Arg Gly Asp Thr
20 25 30

Pro Val Leu Pro His Glu Thr Arg Leu Leu Gln Thr Phe Ile His Val
35 40 45

Arg Val Ser Gln Pro Ser Leu Ile Leu Val Ser Gln Tyr Thr Pro Asp
50 55 60

Ser Thr Pro Cys His Arg Gly Asp Asn Gln Leu Gln Val Gln His Thr
65 70 75 80

Tyr Phe Thr Gly Ser Glu Val Glu Asn Val Ser Val Asn Val His Asn
85 90 95

Pro Thr Gly Arg Ser Ile Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr
100 105 110

Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val
115 120 125

ES 2 601 850 T3

His His Tyr Pro Ser Ala Ala Glu Arg Lys His Arg His Leu Pro Val
 130 135 140

Ala Asp Ala Val Ile His Ala Ser Gly Lys Gln Met Trp Gln Ala Arg
 145 150 155 160

Leu Thr Val Ser Gly Leu Ala Trp Thr Arg Gln Gln Asn Gln Trp Lys
 165 170 175

Glu Pro Asp Val Tyr Tyr Thr Ser Ala Phe Val Phe Pro Thr Lys Asp
 180 185 190

Val Ala Leu Arg His Val Val Cys Ala His Glu Leu Val Cys Ser Met
 195 200 205

Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr Val
 210 215 220

Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Glu Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu
 225 230 235 240

Phe Met His Val Thr Leu Gly Ser Asp Val Glu Glu Asp Leu Thr Met
 245 250 255

Thr Arg Asn Pro Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe
 260 265 270

Thr Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile Lys Pro Gly Lys Ile Ser
 275 280 285

His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu
 290 295 300

Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly Asn Leu Leu
 305 310 315 320

Met Asn Gly Gln Gln Ile Phe Leu Glu Val Gln Ala Ile Arg Glu Thr
 325 330 335

Val Glu Leu Arg Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Phe Phe Asp
 340 345 350

Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu His Pro Thr
 355 360 365

ES 2 601 850 T3

Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr Arg His Thr
 370 375 380

Trp Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp Asp Val Trp
 385 390 395 400

Thr Ser Gly Ser Asp Ser Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr Glu Arg Lys
 405 410 415

Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala Ser Thr Ser
 420 425 430

Ala Gly Arg Lys Arg Lys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala Cys Thr Ala
 435 440 445

Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr Val Ala Pro
 450 455 460

Glu Glu Asp Thr Asp Glu Asp Ser Asp Asn Glu Ile His Asn Pro Ala
 465 470 475 480

Val Phe Thr Trp Pro Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala Arg Asn Leu
 485 490 495

Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys Tyr Gln Glu
 500 505 510

Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu
 515 520 525

Gly Val Trp Gln Pro Ala Ala Gln Pro Lys Arg Arg Arg His Arg Gln
 530 535 540

Asp Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile Ala Ser Thr Pro Lys Lys His Arg
 545 550 555 560

Gly

REIVINDICACIONES

1. Una partícula viral liberada después de la infección de células de mamífero por el citomegalovirus humano (HCMV), donde la partícula viral es un cuerpo denso, donde
 - a) la partícula está rodeada por una membrana lipídica en la que están enclavadas glicoproteínas virales,
 - b) la partícula no contiene ni DNA viral ni cápsides, y
 - c) la partícula contiene una proteína de fusión que comprende una o más partes del antígeno pp65 de las células T y al menos un péptido antigénico heterólogo,
 y donde al menos un péptido antigénico heterólogo está insertado en la posición de aminoácido W175 o A534 de la secuencia de aminoácidos del antígeno pp65 de SEQ ID NO: 1 de las células T.
2. La partícula viral de acuerdo con la reivindicación 1, donde el al menos un péptido heterólogo antigénico está insertado en la posición de aminoácido W175 de la secuencia de aminoácidos del antígeno pp65 de las célula T.
3. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde la secuencia de aminoácidos del antígeno pp65 de las célula T comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 1.
4. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la partícula es altamente antigénica.
5. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la partícula es capaz de inducir la formación de anticuerpos neutralizantes.
6. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la partícula es capaz de inducir una respuesta de los linfocitos T CD8⁺.
7. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el al menos un péptido heterólogo antigénico es un antígeno presentado por el MHC de clase I.
8. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el al menos un péptido heterólogo antigénico comprende o está formado por una o más partes de una o más proteínas que es o son diferentes de pp65.
9. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el al menos un péptido heterólogo antigénico comprende o es una o más partes de una glicoproteína de HCMV.
10. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el al menos un péptido heterólogo antigénico comprende o es una o más partes de la glicoproteína gB de HCMV.
11. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el al menos un péptido heterólogo antigénico comprende o es una o más partes de la glicoproteína gH de HCMV.
12. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el al menos un péptido heterólogo antigénico comprende o consiste en al menos dos glicoproteínas de HCMV que son variantes de una glicoproteína particular de diferentes cepas de HCMV.
13. La partícula viral de acuerdo con la reivindicación 12, donde una de las al menos dos variantes de la glicoproteína particular es la variante de la cepa Towne de HCMV y la otra de las al menos dos variantes de la glicoproteína particular es la variante de la cepa Ad169 de HCMV.
14. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, donde la glicoproteína es la proteína gB de HCMV.
15. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el al menos un péptido heterólogo antigénico comprende o es una o más partes de la proteína IE1 de HCMV.
16. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el al menos un péptido heterólogo antigénico comprende o es una o más partes de una glicoproteína de HCMV y una o más partes de la proteína IE1 de HCMV.
17. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el al menos un péptido heterólogo antigénico es una o más partes de una proteína que es parte de un patógeno humano distinto de HCMV.

18. La partícula viral de acuerdo con la reivindicación 17, donde la proteína que es parte de un patógeno humano distinto de HCMV, es una proteína frente a la cual se forman linfocitos T citotóxicos en seres humanos tras la infección natural de seres humanos con el patógeno humano distinto de HCMV.
- 5 19. La partícula viral de acuerdo con la reivindicación 18, donde el patógeno humano distinto de HCMV es un patógeno humano seleccionado del grupo que comprende HIV-1, HBV, HCV y el virus de la gripe.
20. La partícula viral de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 19, donde la proteína de fusión es una proteína de fusión que comprende un antígeno pp65 de longitud total de las células T y al menos un péptido heterólogo antigénico.
- 10 21. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, o una pluralidad de las mismas, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad.
22. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, o una pluralidad de las mismas, para uso en un método para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad.
- 15 23. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 22, donde la enfermedad es una enfermedad que se puede tratar y/o prevenir por la formación de anticuerpos neutralizantes contra el al menos un péptido heterólogo antigénico o un derivado del mismo, o por la inducción de una respuesta en el linfocito T CD8⁺ contra el al menos un péptido heterólogo antigénico o un derivado del mismo.
24. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, o una pluralidad de las mismas, para la fabricación de una vacuna.
- 20 25. La partícula viral de acuerdo con la reivindicación 24, donde la vacuna es para el tratamiento y/o la prevención de la infección con HCMV.
26. La partícula viral de acuerdo con la reivindicación 24, donde la vacuna es para el tratamiento y/o la prevención de los efectos secundarios de un trasplante.
27. La partícula viral de acuerdo con la reivindicación 26, donde el trasplante es un trasplante de un órgano sólido o células madre hematopoyéticas.
- 25 28. La partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 27, donde el efecto secundario es causado por o va asociado a una infección con HCMV.
- 30 29. El uso de una partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o efectos secundarios, donde la enfermedad o los efectos secundarios es una enfermedad o son unos efectos secundarios como se definen en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 35 30. El uso de una partícula viral de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 para la fabricación de una vacuna para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o efectos secundarios, donde la enfermedad o los efectos secundarios es una enfermedad o son unos efectos secundarios como se definen en cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

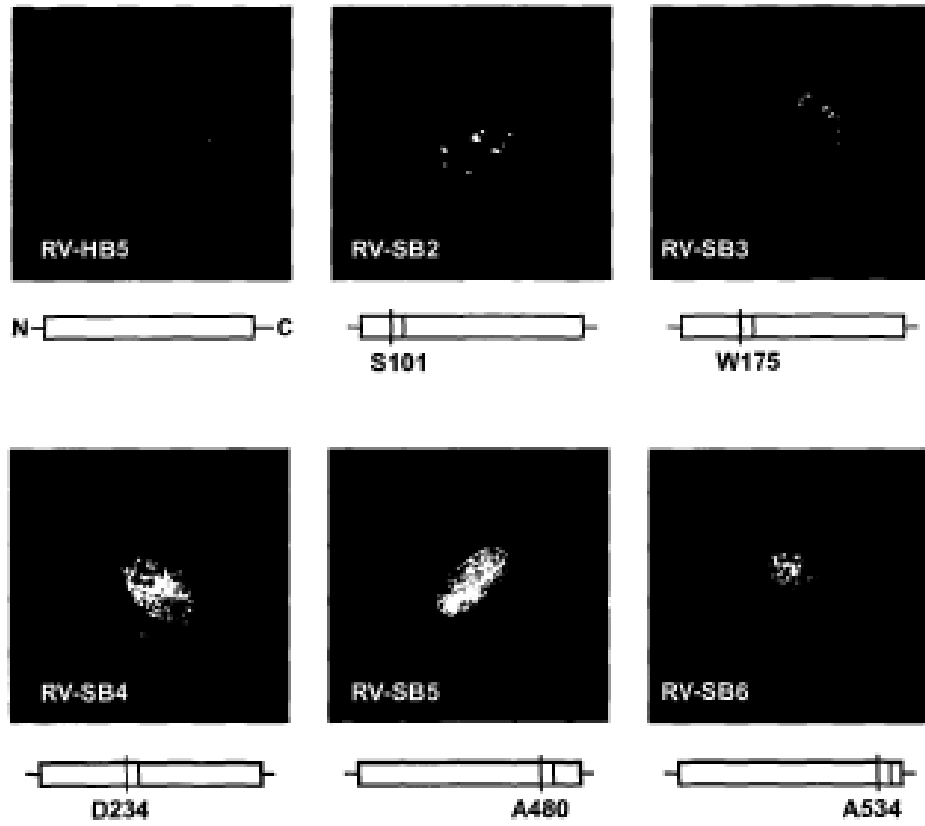


FIG. 1

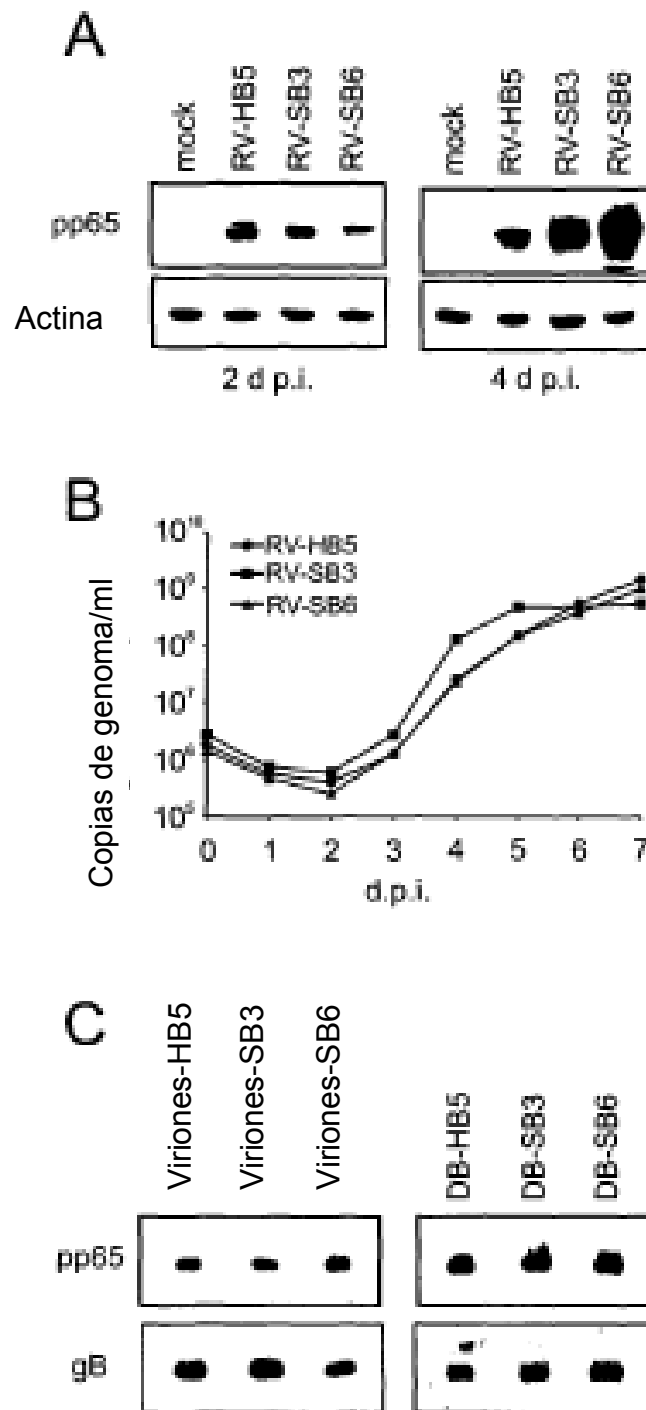


FIG. 2

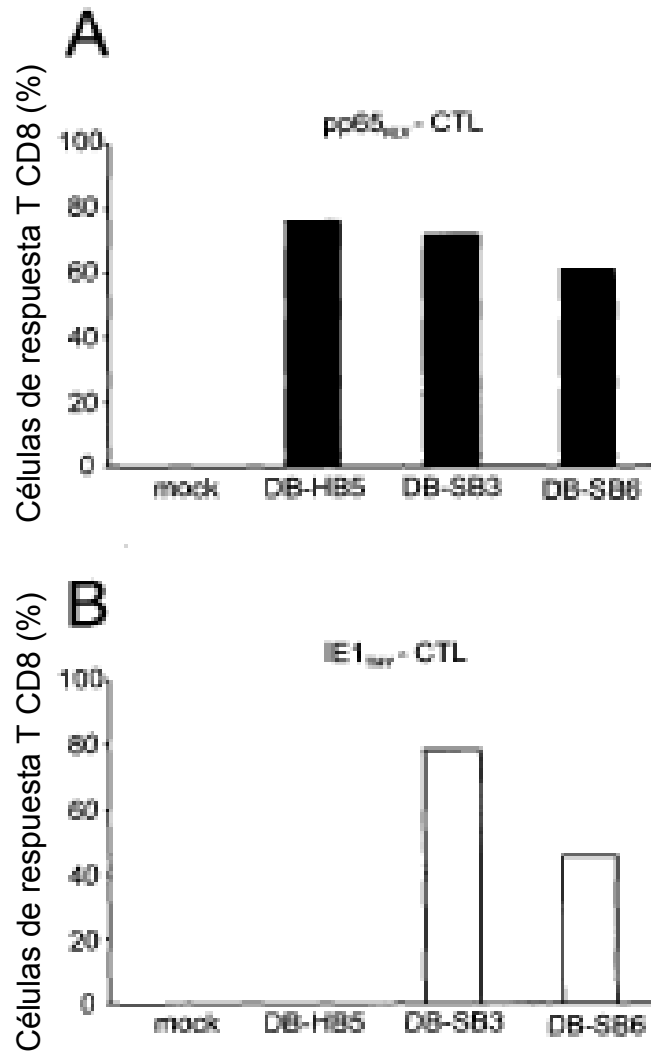


FIG. 3

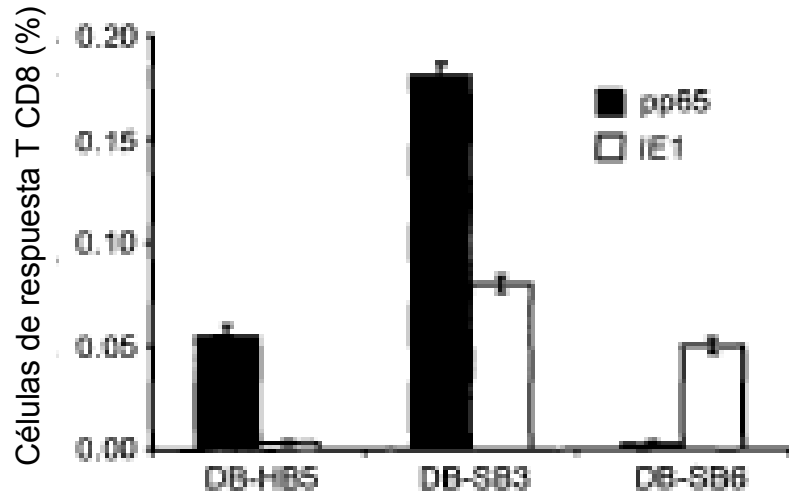


FIG. 4

ES 2 601 850 T3

mesrgrrcpe misvlgpisg hvlkavfsrg dtpvlphetr llqtfihvrv sqpslilvsq
ytpdstpchr gdnqlqvqht yftgsevenv svnhnptgr sicpsqepms iyvyalplkm
lnipsinvhh ypsaaerkhr hlpvadaviih asgkqmwqar ltvsglawtr qqngwkepdv
yytsafvfpt kdvalrhvvc ahelvcsmen tratkmqvig dgyvkvyles fcedvpsgkl
fmhvtlgsdv eedltmtrnp qpfmrphern gftvlcpknm iikpgkishi mldvaftshe
hfgllcpksi pglisignll mngqqiflev qairetvelr qydpvaalff fdidlllqrg
pqysehptft sqyriqgkle yrhtwdrhde gaaqgdddvw tsgsdsdeel vtterktprv
tgggamagas tsagrkrksa ssatactagv mtrgrlkaes tvapeedtde dsdneihnpa
vftwppwqag ilarnlvpmv atvqqnlky qeffwdandi yrifaelegv wqpaaqpkrr
rhrqdalpgp ciastpkkhr g

Fig. 5