

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 535**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
A61K 39/12	(2006.01)
A61K 39/245	(2006.01)
C12N 7/04	(2006.01)
C12N 7/02	(2006.01)
C12N 7/00	(2006.01)
C07K 14/005	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.08.2011 PCT/EP2011/064672**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2012 WO12025603**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2011 E 11751867 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2608806**

54 Título: **Una vacuna contra el virus de Epstein-Barr**

30 Prioridad:

25.08.2010 US 377027 P
25.08.2010 EP 10008835

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2018

73 Titular/es:

**HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN -
DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FÜR
GESUNDHEIT UND UMWELT (GMBH) (50.0%)
Ingolstädter Landstrasse 1
85764 Neuherberg, DE y
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**RUISS, ROMANA;
REISBACH, GILBERT;
HAMMERSCHMIDT, WOLFGANG y
ZEIDLER, REINHARD**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 655 535 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

Una vacuna contra el virus de Epstein-Barr

La presente invención se refiere, entre otros, a una partícula similar a virus que se puede obtener mediante

- 5 (a) transfección de una célula humana con un genoma de VEB modificado, en el que dicho genoma de VEB modificado, en comparación con un genoma de VEB de tipo natural, al menos
- (aa) carece de una o más secuencias que se requieren para el empaquetamiento de dicho genoma de VEB de tipo natural, carece de una o más secuencias que codifican los polipéptidos de VEB requeridos para dicho empaquetamiento y/o comprende una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB cuya capacidad de empaquetamiento está inhabilitada;
- 10 (ab) carece de una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB que se requieren para la transformación de linfocitos B y/o comprende una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB cuya capacidad de transformación de linfocitos B está inhabilitada; y
- (ac) carece de una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB que se requieren para inducir la replicación de un VEB y/o comprende una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB cuya capacidad para inducir la replicación de VEB está inhabilitada;
- 15 (b) cultivo de la célula obtenida en la etapa (a) en condiciones que permitan la expresión de dicho genoma de VEB modificado;
- (c) inducción de la fase replicativa del VEB; y
- (d) aislamiento de dicha partícula
- 20 para su uso en un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria celular CD8+ específica para VEB terapéutica o profiláctica y una respuesta inmunitaria humoral en un individuo humano, comprendiendo dicho procedimiento la administración de dicha partícula a dicho individuo humano.

25 El virus de Epstein-Barr (VEB) es un virus de herpes humano ubicuo que infecta a más de un 90 % de la población mundial con una persistencia de por vida en su hospedador. En la mayoría de los casos, la infección primaria se produce durante la primera infancia y, en general, es asintomática. Por el contrario, si la infección es retardada y se produce durante la adolescencia o la edad adulta, a menudo es sintomática, causando un síndrome linfoproliferativo benigno, normalmente autolimitado, denominado mononucleosis infecciosa (MI) en hasta un 50 % de los casos (Rickinson y Kieff, 2007). Aunque normalmente la enfermedad es autolimitada, se han notificado formas prolongadas de MI (Tobi et al., 1982) o infección crónica activa por VEB (VEBCA) con desenlace fatal (Lu et al., 2009; Imashuku, 2007). También se ha encontrado que la MI clínicamente aparente aumenta significativamente el riesgo de desarrollar enfermedad de Hodgkin y otro tipo de linfoma en una etapa posterior de la vida (Becker et al., 2009, Goldacre et al., 2009). Hoy en día, en general también se acepta que la MI es un factor de riesgo independiente de la esclerosis múltiple (Thacker et al., 2006; Zaadstra et al., 2008) en una etapa posterior de la vida. Además, el VEB se asocia de manera causal a un grupo heterogéneo de enfermedades malignas como carcinoma nasofaríngeo, carcinoma gástrico y varios tipos de linfoma (Lopes et al., 2003), por lo que la OMS clasifica el VEB como carcinógeno de clase I (Niedobitek, 1999).

30

35

Además de la afección médica descrita anteriormente causada por VEB, los pacientes con defectos inmunitarios primarios o secundarios, como los receptores de trasplantes, presentan un riesgo particular de enfermedades asociadas al VEB como consecuencia del efecto perjudicial de los agentes inmunodepresores sobre el control inmunitario de los linfocitos B infectados por VEB. La ELPT asociada al VEB es una forma importante de complicaciones postrasplante que se produce en hasta un 20 % de los receptores de órganos (Everly et al., 2007; Taylor et al., 2005). Es importante destacar que los receptores de trasplantes inmunodeprimidos sin exposición inmunológica previa al VEB al inicio de la inmunodepresión tienen un riesgo particularmente elevado de desarrollar enfermedad linfoproliferativa postrasplante (ELPT) VEB+ potencialmente mortal como consecuencia de una infección primaria por VEB, por ejemplo, a menudo surgida después del trasplante por la transmisión del virus a través de un órgano de donante, debido a la alta prevalencia del VEB. Debido a la deteriorada inmunidad de linfocitos T resultante de la exposición a fármacos inmunodepresores, estos pacientes no pueden sensibilizar de manera eficaz los linfocitos T específicos para VEB que desempeñan un papel crítico en el control de la proliferación de los linfocitos B infectados por VEB. Por el contrario, los pacientes que son seropositivos al VEB en el momento del trasplante tienen un riesgo mucho menor de desarrollar ELPT, lo que demuestra el papel esencial de los linfocitos T específicos para VEB preparados para eliminar las células infectadas por el virus. En general, los pacientes que son seronegativos al VEB antes del trasplante tienen un riesgo mucho mayor de desarrollar enfermedades asociadas al VEB, ya que la transmisión por parte del donante del VEB en los órganos trasplantados o la infección natural con el virus causa enfermedad linfoproliferativa en receptores seronegativos al VEB después del trasplante (p. ej. Mendoza et al., 2006; Swerdlow et al., 2000). Como sucede con muchas enfermedades asociadas a virus, un enfoque prometedor para prevenir y/o tratar la infección por virus y sus consecuencias en el

40

45

50

55

hospedador es la vacunación, algo que también es cierto a la hora de reducir el alto riesgo de ELPT en pacientes seronegativos inmunizándolos al VEB antes al trasplante.

Estas enfermedades asociadas al VEB ofrecen argumentos sólidos para el desarrollo de una vacuna contra el VEB que sea segura y eficiente para hacer frente a las infecciones víricas posteriores y a las enfermedades asociadas al virus. Los primeros ensayos en humanos con vacunas experimentales se realizaron en la década de los 90 usando un virus vaccinia recombinante que expresaba el principal antígeno de membrana de VEB, BLLF-1, produciendo un mayor número de títulos de anticuerpos neutralizantes del VEB (Gu et al., 1995). Más recientemente, se han descrito diferentes vacunas profilácticas basadas en péptidos dirigidos a la seroconversión y prevención de la MI en voluntarios sanos (Elliott et al., 2008; Moutschen et al., 2007; Sokal et al., 2007) y en niños a la espera de trasplante renal (Rees et al., 2009). En cuatro de estos niños receptores se detectaron anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, las respuestas inmunitarias disminuyeron rápidamente y resultó poco probable que afectaran a los eventos posteriores al trasplante.

Los virus vivos atenuados son vacunas polivalentes que protegen de manera eficiente contra la infección por virus de tipo natural y enfermedades asociadas. La atenuación genética se logra, en general, mediante pases sucesivos del virus en células permisivas. Desafortunadamente, no existe un sistema lítico que permita la atenuación génica espontánea para el VEB, a diferencia de lo que sucede para otros virus del herpes como *Varicella zoster*. La seroconversión mediante la infección deliberada de las personas con VEB de tipo natural sería, en principio, fácil, pero se considera poco ética, ya que el virus es claramente oncógeno *per se*. Además, las vacunas vivas atenuadas no se suelen estar recomendadas para muchos grupos de pacientes inmunodeprimidos con inmunodeficiencias primarias y secundarias (Pickering et al., 2009) debido a los riesgos de efectos secundarios graves y de infecciones diseminadas (Duchini et al., 2003; Succi y Farhat, 2006).

Feederle (2005), J. Virology, vol. 79, No. 12, 7641-7647 informa de que la inducción del ciclo lítico en células 293/TR conduce a la producción de una gran cantidad de partículas víricas vacías del VEB.

Las vacunas monovalentes contra el VEB basadas en vacunas de la subunidad gp350 se están estudiando desde hace más de veinte años con diferentes resultados: una formulación indujo anticuerpos neutralizantes con éxito en voluntarios sanos incluidos en un estudio de fase clínica I/II (Moutschen et al., 2007), mientras que otra formulación de vacuna en niños a la espera de trasplante renal no ha podido influir en los títulos de VEB postrasplante ni proteger frente a la ELPT (Rees et al., 2009), probablemente porque gp350 no se suele expresar en ELPT y otras neoplasias asociadas al VEB. Por lo tanto, existen dudas de que una vacuna gp350 pueda reducir el riesgo de desarrollar cáncer asociado al VEB.

En WO 2009/068615 y Adhikary et al., 2008 se describe la generación de partículas similares a virus (PSV) que se caracterizan por que no comprenden ADN vírico o no comprenden ADN transformador de VEB. Dichas partículas se emplean en un procedimiento *ex vivo* de acuerdo con el cual se generan células CD4+ específicas para antígeno estructural de VEB. Debido a la presencia potencial de oncogenes en el ADN desprovisto de ADN transformador de VEB y a la presencia de proteínas transformadoras en las PSV, no se pueden emplear en humanos por motivos éticos y de seguridad. Además, las células CD4+ generadas no se pueden considerar una vacuna potente, y mucho menos se pueden usar como vacuna profiláctica, ya que solo se han generado células CD4+ a partir de donantes VEB-positivos, y no se pueden sensibilizar células inmunitarias específicas para VEB en un individuo sin exposición previa al VEB.

El problema técnico subyacente de la presente invención era identificar medios y procedimientos alternativos y/o mejorados que permitieran la vacunación terapéutica y preventiva contra la infección por VEB y las enfermedades asociadas al VEB.

La solución a dicho problema técnico se consigue proporcionando los modos de realización caracterizados en las reivindicaciones.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a

una partícula similar a virus que se puede obtener mediante

(a) transfección de una célula humana con un genoma de VEB modificado, en el que dicho genoma de VEB modificado, en comparación con un genoma de VEB de tipo natural, al menos

(aa) carece de una o más secuencias que se requieren para el empaquetamiento de dicho genoma de VEB de tipo natural, carece de una o más secuencias que codifican los polipéptidos de VEB requeridos para dicho empaquetamiento y/o comprende una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB cuya capacidad de empaquetamiento está inhabilitada;

(ab) carece de una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB que se requieren para la transformación de linfocitos B y/o comprende una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB cuya capacidad de transformación de linfocitos B está inhabilitada; y

(ac) carece de una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB que se requieren para inducir la replicación de un VEB y/o comprende una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB cuya capacidad para inducir la replicación de VEB está inhabilitada;

5 (b) cultivo de la célula obtenida en la etapa (a) en condiciones que permitan la expresión de dicho genoma de VEB modificado;

(c) inducción de la fase replicativa del VEB; y

(d) aislamiento de dicha partícula

10 para su uso en un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria celular CD8+ específica para VEB terapéutica o profiláctica y una respuesta inmunitaria humoral en un individuo humano, comprendiendo dicho procedimiento la administración de dicha partícula a dicho individuo humano.

15 El término "vacuna", como se emplea en la presente invención, significa inmunizar profiláctica o terapéuticamente a un individuo contra VEB. La vacuna de acuerdo con la presente invención inmuniza a un individuo contra la infección por VEB y las enfermedades asociadas al VEB. La inmunización se relaciona con el proceso de estimulación y sensibilización del sistema inmunitario hacia el antígeno o antígenos de la vacuna. De acuerdo con la invención, inmunización profiláctica se refiere a la primera exposición del sistema inmunitario de un individuo, es decir, un sistema inmunitario no expuesto, a antígenos de VEB. Dicha primera exposición da como resultado el aclaramiento de dichos antígenos del cuerpo del individuo expuesto y el desarrollo de células CD4+ y CD8+ específicas para antígeno de VEB y linfocitos B de memoria productores de anticuerpos. Tras una segunda exposición, el sistema inmunitario puede prevenir la infección por VEB y/o eliminar dicha infección de manera más efectiva, evitando o mitigando el desarrollo de enfermedades asociadas al VEB. De forma específica, los efectos de dicha inmunización profiláctica se manifiestan en al menos una de las siguientes formas: previniendo la infección del individuo inmunizado con VEB, modificando o limitando la infección, ayudando, mejorando, potenciando o estimulando la recuperación de dicho individuo de la infección y generando memoria inmunológica que evitará o limitará una infección posterior por VEB. La presencia de cualquiera de dichos efectos se puede probar y detectar mediante procedimientos de rutina conocidos por el experto en la técnica. Preferentemente, el paciente es estimulado con uno o más antígenos de VEB que han formado parte de la vacuna utilizada y se determinan los títulos de anticuerpos y el número de linfocitos T contra dicho uno o más antígenos. Además, se puede determinar la inducción de anticuerpos neutralizantes que inhiben la infección de linfocitos B humanos *in vitro*.

30 Aunque provoca igualmente una respuesta inmunitaria contra antígenos de VEB, la inmunización terapéutica de acuerdo con la presente invención se realiza en individuos que han sido expuestos a VEB antes de dicha inmunización, es decir, que ya están infectados por VEB. En este caso, la inmunización conduce a la reactivación de linfocitos T efectores en reposo, que se enfrentan a los antígenos afines de tal forma que estos antígenos son presentados por células presentadoras de antígeno profesionales en asociación con moléculas MHC clase I y/o MHC clase II. La inmunización terapéutica contra el VEB puede ser particularmente relevante en casos en los que la reactivación del virus es indeseable, como en receptores de trasplantes o pacientes inmunodeprimidos (individuos VIH positivos, pacientes con cáncer, pacientes con enfermedades inflamatorias o autoinmunes graves) o en casos en los que la reactivación del VEB puede provocar o ha provocado el desarrollo de una enfermedad como trastorno linfoproliferativo postrasplante (ELPT) y linfoma no Hodgkin, infección crónica activa por VEB (VEBCA), leucoplasia vellosa oral o, en los casos en los que la capacidad de transformación de linfocitos B del VEB ha provocado el desarrollo de una enfermedad como, por ejemplo, cáncer.

45 Además de comprender los antígenos del VEB que, de acuerdo con la presente invención, están comprendidos en una partícula como se describe en detalle a continuación, una vacuna de acuerdo con la invención puede comprender además vehículos farmacéuticamente aceptables que incluyen cualquier vehículo que no provoque por sí mismo una respuesta inmunitaria o cualquier otra reacción adversa dañina para la persona que recibe la vacuna. Los vehículos adecuados son típicamente grandes macromoléculas que se metabolizan lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y agregados de lípidos tales como, por ejemplo, gotículas de aceite o liposomas. Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados adicionales son bien conocidos en la técnica. Adicionalmente, dichos vehículos pueden funcionar como otros agentes inmuoestimulantes que se describirán con más detalle a continuación. Además, la vacuna puede comprender diluyentes tales como, por ejemplo, agua, solución salina, glicerol, etanol, etc. Además, las sustancias necesarias para la formulación pueden estar comprendidas en una vacuna como agentes emulsionantes y/o sustancias tamponadoras de pH. Cualquier combinación de las sustancias mencionadas anteriormente puede formar parte de una vacuna de acuerdo con la invención según sea necesario.

55 La cantidad necesaria y el régimen de tratamiento para una inmunización efectiva pueden variar y dependen de factores tales como el tamaño del individuo, el área de superficie corporal, la edad, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros medicamentos administrados simultáneamente. Se espera que dicha cantidad efectiva esté en un amplio intervalo y se puede determinar fácilmente para cualquier situación dada mediante experimentación rutinaria y está dentro de las habilidades y el juicio del médico o clínico habitual. El modo de administración puede ser cualquier modo de administración que dé como resultado la inmunización del individuo

expuesto a la vacuna de inmunización e incluye administración parenteral tal como, por ejemplo, inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea, intraarticular o infusión e inhalación. así como la administración enteral. Preferentemente, la vacuna se administra al menos 2 veces para maximizar el efecto de la inmunización.

5 El término "partícula", tal como se usa en la presente invención, se refiere a un conglomerado de partículas de polipéptidos de VEB y lípidos de membrana, siempre que estén desprovistos de ADN de VEB. El término "polipéptido" se refiere a moléculas que consisten en más de 30 aminoácidos consecutivos. De acuerdo con la presente invención, también se concibe el uso de "péptidos", es decir, moléculas que comprenden hasta 30 aminoácidos, en lugar de polipéptidos. En la medida en que dichos péptidos contribuyan al efecto inmunizante de dicha partícula, se entiende que comprenden un epítipo antigénico de VEB. El término "polipéptido" también abarca los fragmentos de polipéptidos. El término "fragmento de un polipéptido" se refiere a una porción de un polipéptido que puede estar o no vinculada a una actividad (biológica) del polipéptido de longitud completa. Preferentemente, una actividad es atribuible al fragmento. Los polipéptidos pueden además formar dímeros, trímeros y oligómeros superiores, es decir, que consisten en más de una molécula polipeptídica. Las moléculas polipeptídicas que forman dichos dímeros, trímeros, etc. pueden ser idénticas o no idénticas. Las correspondientes estructuras de orden superior se denominan, en consecuencia, homo- o heterodímeros, homo- o heterotrímeros etc. Los homo- o heterodímeros, etc. también entran dentro de la definición del término "polipéptido". Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren también a polipéptidos modificados de forma natural en los que la modificación se logra, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Dichas modificaciones son bien conocidas en la técnica. Los polipéptidos denominados "polipéptidos de VEB" de acuerdo con la invención son polipéptidos que son idénticos en cuanto a su secuencia de aminoácidos a los polipéptidos de VEB. El término "VEB", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cepa natural de VEB, es decir, de origen natural, y no está restringido a una cepa particular. De forma específica, las cepas VEB tipo 1 y VEB tipo 2 son bien conocidas en la técnica y se han caracterizado ampliamente. Estos dos tipos de VEB difieren ampliamente en los genes de polipéptidos nucleares que codifican EBNA-LP, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B y EBNA-3C. Más allá de las diferencias relacionadas con los genes que codifican polipéptidos de la familia EBNA, los genomas de tipo 1 y 2 difieren escasamente. El tipo 1 prevalece predominantemente entre las poblaciones del mundo desarrollado, mientras que el tipo 2 también es prevalente en África ecuatorial y Nueva Guinea (Kieff y Rickinson, 2007, para revisión). Además, el término polipéptido de VEB comprende también polipéptidos que no son idénticos a las cepas de VEB de tipo natural en cuanto a su secuencia, pero comprende proteínas que compartan al menos (para cada valor) un 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 % y al menos un 75 % de identidad de secuencia con un polipéptido de VEB de tipo natural. El grado de identidad de las secuencias polipeptídicas se puede calcular mediante procedimientos bien conocidos por el experto en la técnica y puede comprender la ejecución automática de algoritmos que efectúan la alineación de datos de secuencia y el cálculo de homología de secuencia. Los polipéptidos de VEB de la partícula se pueden originar a partir de diferentes cepas de VEB; preferentemente se originan a partir de una cepa.

Como se mencionó anteriormente, los polipéptidos de VEB que deben estar comprendidos en la partícula pertenecen a los grupos de polipéptidos estructurales de VEB y polipéptidos líticos de VEB. Como entenderá el experto, un polipéptido particular de VEB puede pertenecer a más de uno de los grupos de polipéptidos mencionados anteriormente. En otras palabras, un polipéptido de VEB puede representar un polipéptido estructural, así como un polipéptido lítico, como será evidente a partir de los polipéptidos de VEB específicos mencionados en los párrafos siguientes. En este último caso, la partícula no necesita comprender otro polipéptido de VEB que sea un polipéptido estructural o lítico. Preferentemente, la partícula comprende al menos un polipéptido de VEB separado de cada uno de los grupos de polipéptidos de VEB mencionados anteriormente, ya que esto aumenta típicamente el potencial antigénico de la vacuna. Más preferente es que al menos (para cada valor) 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o al menos 12 polipéptidos separados formen parte independientemente de cada uno de dichos grupos polipeptídicos comprendidos en la partícula de la vacuna

De acuerdo con la invención, el término "polipéptido estructural" de VEB se refiere a polipéptidos implicados en la configuración estructural del VEB. Dichos polipéptidos se seleccionan preferentemente entre el grupo que consiste en polipéptidos de membrana, polipéptidos de tegumento y polipéptidos de cápside. Los polipéptidos de membrana de VEB comprenden los polipéptidos seleccionados entre el grupo que consiste en BALF4, BLLF1 (también denominado gp350), BDLF2, BDLF3, BKRF2, BLRF1, BNLF1 (también denominado LMP-1), TP (también denominado LMP-2a), BXLF2, BZLF2 y cualquier combinación de los mismos. Los polipéptidos de tegumento de VEB comprenden los polipéptidos seleccionados entre el grupo que consiste en BBRF2, BGLF2, BMLF1, BNRF1, BOLF1, BPLF1, BTRF1, BVRF1 y cualquier combinación de los mismos. Los polipéptidos de cápside de VEB comprenden los polipéptidos seleccionados entre el grupo que consiste en BBRF1, BcLF1, BDLF1, BFRF3 y cualquier combinación de los mismos. Preferentemente, el al menos un polipéptido estructural se selecciona entre el grupo que consiste en BLLF1, BMLF1, BNRF1 o cualquier combinación de los mismos, tales como BLLF1 y BMLF1, BLLF1 y BNRF1, o BMLF1 y BNRF1.

60 El término "polipéptidos líticos" se refiere a polipéptidos de VEB que están implicados en la inducción y el mantenimiento del ciclo lítico del VEB (en este documento también denominado fase replicativa) y/o que se expresan como consecuencia de la inducción del ciclo lítico. Dichos polipéptidos líticos se seleccionan preferentemente entre el grupo que comprende los genes tempranos inmediatos, los genes tempranos y los genes

líticos tardíos (Kieff y Rickinson, 2007). El ciclo lítico se inicia con la expresión de BZLF1 y BRLF1, ambas proteínas tempranas inmediatas, seguida de la expresión de las proteínas tempranas y tardías. Después de la inducción, las células que se han vuelto permisivas para la replicación del virus experimentan cambios citopáticos característicos de los herpesvirus (Kieff y Rickinson, 2007). Los polipéptidos líticos ejemplares que se pueden usar de acuerdo con la invención se seleccionan entre el grupo que comprende BZLF1, BRLF1, BMRF1, BMLF1, BALF2, BALF5, BGL2, BHRF1, BALF4, BDLF3 y cualquier combinación de los mismos. Preferentemente, el al menos un polipéptido lítico es BLLF1 (también denominado gp350) o cualquier combinación del mismo.

El término "lípidos de membrana", como se usa de acuerdo con la presente invención, se refiere a lípidos que son capaces de disponerse espontáneamente para formar una bicapa lipídica. Dichos lípidos de membrana son lípidos que comprenden una región hidrofóbica y una región hidrófila, en los que, después del autoensamblaje, las regiones hidrófobas de los lípidos de membrana forman la parte interna de la bicapa mientras que las regiones hidrófilas forman la cara externa de la membrana. Preferentemente, los lípidos de membrana son lípidos que forman naturalmente membranas celulares tales como fosfolípidos anfipáticos. También es preferente que dichos lípidos de membrana se originen a partir de una célula hospedadora en la que el VEB de tipo natural sea capaz de replicarse. Más preferentemente, dichos lípidos de membrana se originan a partir de una célula de acuerdo con la presente invención. De acuerdo con la invención, las membranas comprendidas en la partícula están presentes en una cantidad suficiente para formar una membrana que constituya la cubierta exterior de la partícula. La partícula debe poseer dicha cubierta externa de membrana, que preferentemente comprende al menos un polipéptido estructural de VEB. Como se describe a continuación, los ejemplos preferentes de polipéptidos estructurales de VEB unidos a membrana son el polipéptido gp350 y el polipéptido LMP-1. Como se detalla adicionalmente a continuación, la capacidad de transformación de linfocitos B de LMP-1 puede estar inhabilitada. También es preferente que la membrana de la partícula comprenda otros constituyentes de membrana que también se encuentran naturalmente en una membrana de VEB, como, por ejemplo, polipéptidos de membrana adicionales que se pueden encontrar en el interior, en el exterior de la membrana o que abarcan la membrana.

La partícula está "desprovista de ADN de VEB", lo que significa que la partícula no comprende ADN de VEB, es decir, no se puede detectar ADN de VEB. De forma específica, el término "ADN", de acuerdo con la presente invención, incluye cualquier ADN, tal como ADNc o ADN genómico. Además, el término "ADN", tal como se usa en este contexto, incluye moléculas que imitan ADN conocidas en la técnica, tales como derivados sintéticos o semisintéticos de ADN y polímeros mixtos, tanto cadenas sentido como antisentido. Dichas moléculas que imitan ADN o derivados de ADN de acuerdo con la invención incluyen ácido nucleico de fosforotioato, ácido nucleico de fosforamidoato, ácido 2'-O-metoxietil-ribonucleico, ácido nucleico de morfolino, ácido nucleico de hexitol (HNA) y ácido nucleico bloqueado (ANB) (Braasch y Corey, 2001). El ANB es un derivado de ARN en el que el anillo de ribosa está limitado por un enlace metileno entre el oxígeno 2' y el carbono 4'. Pueden contener bases nucleotídicas no naturales o derivadas adicionales, como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Por consiguiente, la partícula no debe comprender secuencias de ADN que sean idénticas a las secuencias de ADN del VEB, en las que dichas secuencias se refieren preferentemente a las secuencias de genes del VEB. Además, la partícula no debe comprender secuencias de ácido nucleico que compartan al menos un (para cada valor) 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 % y al menos un 75 % de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico de VEB de tipo natural. El grado de identidad de secuencia de las secuencias de ácido nucleico se puede calcular mediante procedimientos bien conocidos por el experto en la técnica y puede comprender la ejecución automática de algoritmos que efectúan la alineación de datos de secuencia y el cálculo de homologías de secuencia. Además, la partícula no puede comprender una secuencia de ADN que, tras la expresión, genere un polipéptido que se asemeje funcionalmente a un polipéptido de VEB, en el que la semejanza funcional se refiere preferentemente a la capacidad de transformación de linfocitos B. Los procedimientos para someter a ensayo la semejanza funcional de los polipéptidos incluyen ensayos *in silico* así como *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, para determinar la semejanza funcional se pueden generar mutantes de eliminación de VEB y realizar análisis de complementación. De forma específica, un mutante de eliminación de VEB se caracteriza por que se elimina la secuencia de un gen que codifica, por ejemplo, un polipéptido que es esencial en la transformación de linfocitos B. Como resultado, dicho mutante de eliminación no es capaz de transformar los linfocitos B. Para someter a ensayo la semejanza funcional de una secuencia de ADN con la secuencia de VEB eliminada, dicho ADN sometido a ensayo se suministra al mutante de eliminación, por ejemplo, mediante la incorporación de dicho ADN sometido a ensayo al ADN genómico de dicho mutante de eliminación. Posteriormente, se determina si el mutante de eliminación así modificado es capaz de transformar linfocitos B, es decir, si complementa la eliminación y da como resultado un VEB que funcionalmente se asemeja a un VEB de tipo natural. Las variaciones de dicho análisis de complementación son conocidas en la técnica y se pueden adaptar adicionalmente a las necesidades específicas del experto en función de sus conocimientos técnicos en el campo.

En un modo de realización adicional, se prevé que no ningún ADN de ningún tipo esté comprendido en la vacuna o en la partícula comprendida en la vacuna.

La partícula puede, sin embargo, comprender ARN de VEB. Se entiende que el término "ARN", como se usa en el presente documento, comprende todas las formas de ARN que incluyen ARNm, ARNnc (ARN no codificante), ARNt y ARNr. El término "ARN no codificante" incluye ARNip de origen natural (ARN interferente pequeño), miARN (microARN), ARNipar (ARN asociado de repetición), ARNpno (ARN pequeño nucleolar) y ARNpn (ARN pequeño nuclear). El ARNm vírico, cuando está comprendido en la partícula como se describe en el presente documento en

diversos modos de realización, se podría traducir en células infectadas y los péptidos derivados de los polipéptidos traducidos se podrían presentar en asociación con antígenos MHC de clase I de manera que sensibilicen o reactiven los linfocitos T CD8+. Los ARNm víricos de VEB correspondientes son moléculas de ARNm cuyos transcritos se mencionaron anteriormente que pertenecen a los "polipéptidos estructurales y polipéptidos líticos" del VEB. Por ejemplo, la partícula puede comprender ARNm de VEB vírico que codifica BALF4, BLLF1 (también denominado gp350), BDLF2, BDLF3, BKRF2, BLRF1, BNLF1 (también denominado LMP-1), TP (también denominado LMP-2a), BXLF2, BZLF2, BBRF2, BGLF2, BMLF1, BNRF1, BOLF1, BPLF1, BTRF1, BVRF1, BBRF1, BcLF1, BDLF1, BFRF3 (como "polipéptidos estructurales") y/o BZLF1, BRLF1, BMRF1, BMLF1, BALF2, BALF5, BGL2, BHRF1, BALF4, BDLF3 (como "polipéptidos líticos"); y/o los polipéptidos correspondientes cuya capacidad de transformación se ha inhabilitado mientras se mantiene su inmunogenicidad. Preferentemente, la molécula o moléculas de ARNm vírico de VEB comprendidas en la partícula de acuerdo con la invención codifican los "polipéptidos estructurales" y/o "polipéptidos líticos" preferentes y/o los polipéptidos correspondientes cuya capacidad de transformación se ha inhabilitado mientras se mantiene su inmunogenicidad o combinaciones preferentes de los mismos descritas anteriormente en el presente documento por estar comprendidos en una partícula o ser constituyentes de la misma. En otras palabras, los transcritos de las moléculas de ARNm comprendidos en la partícula reflejan la composición de polipéptidos de VEB de la partícula de acuerdo con la invención. Se prevé igualmente que la partícula pueda comprender, de forma alternativa o adicional, ARNm de VEB cuyo transcrito no esté comprendido en la partícula. Por ejemplo, el ARNm que codifica BZLF1 y/o BRFL1 puede estar comprendido en una partícula de acuerdo con la invención, mientras que los polipéptidos BZLF1 y/o BRLF1 no están comprendidos en dicha partícula. También se prevé que la partícula no comprenda una molécula de ARNm que codifique todos los polipéptidos comprendidos en la partícula según la invención, es decir, que refleje la composición de polipéptidos de VEB de dicha partícula. Preferentemente, al menos BRLF1 y/o BZLF1 que codifican ARNm de VEB están comprendidos en la partícula de acuerdo con la invención. La incorporación de ARNm en dicha partícula se puede lograr, por ejemplo, con el procedimiento descrito a continuación en el presente documento, en el que las moléculas de ARNm de VEB presentes en la célula que expresa el genoma de VEB modificado se incorporan en partículas. Otros procedimientos para incorporar ARNm de VEB en las partículas de acuerdo con la invención incluyen, por ejemplo, electroporación, lipofección u otros procedimientos conocidos en la técnica para efectuar la transferencia de ácidos nucleicos a través de una membrana lipídica. De acuerdo con la invención, se entiende que cualquier molécula de ARNm presente en la partícula de la invención no es capaz de inducir la transformación de la célula infectada a un estado proliferativo. El experto en la técnica entenderá que la expresión de polipéptidos de VEB potencialmente transformadores de dichos ARNm de VEB comprendidos en la partícula no será suficiente para inducir la transformación de una célula infectada debido a la inestabilidad de las moléculas de ARNm y a la baja tasa de polipéptidos de VEB expresados resultante. Sin embargo, el experto está en situación de determinar qué ARNm puede usar y/o qué tipo de modificaciones hay que efectuar en los ARNm de VEB correspondientes para excluir la expresión de polipéptidos de VEB que tienen actividad transformadora solos o en combinación con polipéptidos de VEB adicionales, si esto fuera necesario para fines regulatorios en el proceso de aprobación como agente activo de un fármaco.

En otro modo de realización, se prevé que ningún ARN de ningún tipo esté comprendido en la vacuna o en la partícula comprendida en la vacuna.

Además, se prevé que ningún ácido nucleico de ningún tipo esté comprendido en la vacuna o en la partícula comprendida en la vacuna.

Esta ausencia de la partícula de al menos el ADN del VEB se debe a la capacidad del VEB de tipo natural de transformar los linfocitos B en células que son capaces de un crecimiento indefinido. Esto se debe a la presencia de oncogenes potenciales en el genoma de VEB de tipo natural, es decir, genes que están implicados en el desarrollo del cáncer. Por lo tanto, y con respecto a la seguridad de la vacuna de la invención tras su administración al individuo que se desea inmunizar, la exclusión del ADN del VEB de la vacuna, más específicamente de la partícula, da como resultado la minimización del riesgo de que dicho individuo que se desea inmunizar experimente transformación de linfocitos B o desarrolle cáncer como consecuencia directa de la vacunación. Esto es particularmente importante en el caso de individuos que no han estado expuestos a ni infectados por VEB previamente; véase la parte introductoria arriba en el presente documento.

Como una característica adicional que aumenta la seguridad de la vacuna tras la administración al tiempo que contribuye a la inmunogenicidad, la partícula puede comprender uno o más polipéptidos de VEB requeridos para la transformación de linfocitos B cuya capacidad de transformación de linfocitos B está inhabilitada mientras se mantiene su inmunogenicidad. *In vitro*, la transformación de linfocitos B por VEB conduce a la proliferación de linfocitos B infectados durante períodos prolongados. El término "requerido para la transformación de linfocitos B" significa, de acuerdo con la invención, que dicho uno o más polipéptidos de VEB son esenciales en la transformación de linfocitos B tras la infección por un VEB de tipo natural. En otras palabras, en ausencia de dicho uno o más polipéptidos de VEB esenciales, un linfocito B no se transforma tras la infección. En consecuencia, tras la fusión con el linfocito B, la partícula es incapaz de transformar el linfocito B. Aunque puede ser suficiente para inhabilitar la capacidad de transformación de linfocitos B de un polipéptido de VEB esencial con el fin de excluir la posibilidad de transformación de linfocitos B, alternativamente se puede inhabilitar la capacidad de transformación de linfocitos B de una combinación esencial de polipéptidos de VEB para lograr el mismo resultado logrado cuando solo se inhabilita un polipéptido esencial, es decir, lograr excluir la posibilidad de transformación de linfocitos B. Preferentemente, la capacidad de transformación de linfocitos B de más de un polipéptido de VEB esencial o de la

combinación esencial de polipéptidos de VEB está inhabilitada. Los polipéptidos de VEB correspondientes que son esenciales en la transformación de linfocitos B son EBNA2, LMP1, EBNA-LP. Inhabilitar la capacidad de transformación de linfocitos B de uno de estos polipéptidos de VEB es suficiente para excluir la posibilidad de transformación de linfocitos B. Las combinaciones esenciales de polipéptidos de VEB que se requieren para la transformación de linfocitos B son EBNA3A y EBNA3C, LMP-2A y EBNA3A, o LMP-2A y EBNA3C. Como comprenderá fácilmente el experto, aunque en la partícula solo esté presente un miembro de una combinación esencial correspondiente, su capacidad de transformación de linfocitos B se debe inhabilitar, ya que todavía es capaz por sí solo de transformar un linfocito B. Esto se aplica igualmente a la presencia de más miembros de una combinación, siempre que la combinación no sea completa, es decir, que no todos los miembros requeridos para excluir la posibilidad de transformación de linfocitos B estén presentes en la partícula. En otras palabras, la posibilidad de transformación de linfocitos B sólo se excluye cuando todos los miembros de una combinación esencial están inhabilitados.

Se entiende que, para garantizar la seguridad de la vacuna, una partícula que comprende dicho uno o más polipéptidos de VEB requeridos para la transformación de linfocitos B cuya transformación de linfocitos B ha sido inhabilitada no comprende al mismo tiempo el correspondiente polipéptido de VEB funcional homólogo.

Lo anterior se aplica *mutatis mutandis* para los modos de realización a continuación.

La inhabilitación de la capacidad para transformar linfocitos B se puede lograr mediante procedimientos tales como la modificación del dominio del polipéptido que está involucrado funcionalmente en el proceso de transformación de linfocitos B. Dicha modificación se puede lograr mediante procedimientos tales como, por ejemplo, la eliminación de dicho dominio funcional o de partes del mismo, la inhibición estérica de dicho dominio funcional o del polipéptido completo, o la sustitución de uno o más aminoácidos de dicho dominio funcional con el fin de que la función quede comprometida. Cuando se inhabilita la capacidad de transformación de linfocitos B de un polipéptido, se debe mantener su inmunogenicidad. El experto en la técnica está en condiciones de determinar fácilmente las regiones antigénicas de una proteína y los epítomos antigénicos específicos en dichas regiones empleando procedimientos experimentales de rutina *in silico*, así como *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. Después de determinar dicha región antigénica, estará en condiciones de elegir una estrategia que sea adecuada para mantener la inmunogenicidad de un polipéptido al tiempo que inhabilita su capacidad de transformación de linfocitos B. De esta manera, se pueden obtener polipéptidos de VEB funcionalmente inhabilitados pero inmunogénicos. Por ejemplo, y en el caso de polipéptidos transmembranarios que tienen capacidad de transformación de linfocitos B tal como, por ejemplo, LMP-1 (también denominado BNLF1), dicho polipéptido se puede truncar eliminando solo la porción transmembranaria de dicho polipéptido pero conservando la parte extramembranaria de dicho polipéptido en el exterior de la partícula de virus.

De forma alternativa o adicional, la partícula puede estar desprovista de uno o más polipéptidos de VEB que se requieren para la transformación de linfocitos B. La partícula puede carecer de cualquiera de los polipéptidos de VEB requeridos para la transformación de linfocitos B mencionados anteriormente o de las combinaciones de polipéptidos de VEB requeridos para la transformación de linfocitos B. Sin embargo, y de acuerdo con la invención, la partícula sigue siendo inmunogénica debido a la presencia de otras partículas de VEB tales como el al menos un polipéptido estructural de VEB y el al menos un polipéptido lítico de VEB. En el caso de que falten uno o más polipéptidos transformadores y al menos un polipéptido de VEB esté inhabilitado, se entiende que el uno o más polipéptidos de VEB que faltan no se pueden inhabilitar al mismo tiempo. En otras palabras, si dicho uno o más polipéptidos de VEB está inhabilitado, no puede faltar al mismo tiempo. Si una combinación de polipéptidos de VEB es esencial en la transformación de linfocitos B, un primer miembro de la combinación puede estar inhabilitado mientras que puede faltar un segundo miembro.

Las definiciones y explicaciones proporcionadas para este modo de realización se aplican *mutatis mutandis* para todos los modos de realización a continuación a menos que se indique explícitamente lo contrario.

En general y también de acuerdo con la presente invención, es deseable que la vacuna comprenda tantos polipéptidos de VEB diferentes como sea posible para maximizar el potencial antigénico de la vacuna. Por lo tanto, la presente invención se refiere en un modo de realización alternativo a una vacuna que comprende una partícula, comprendiendo dicha partícula un VEB modificado en el que, en comparación con un VEB de tipo natural, dicho VEB modificado está desprovisto de ADN de VEB y en el que (a) la capacidad de transformación de linfocitos B de uno o más polipéptidos de VEB requeridos para la transformación de linfocitos B tal como se comprende en dicha partícula está inhabilitada mientras se mantiene su inmunogenicidad; y/o (b) dicha partícula está desprovista de uno o más polipéptidos de VEB requeridos para la transformación de linfocitos B.

En un modo de realización preferente de dicho modo de realización alternativo, dicho VEB modificado difiere del VEB de tipo natural únicamente con respecto a las características identificadas anteriormente.

Este modo de realización alternativo tiene en cuenta la capacidad antigénica completa del VEB de tipo natural pero excluye el potencial de la vacuna para inducir la transformación de linfocitos B u otras enfermedades asociadas al VEB, tales como, por ejemplo, mononucleosis infecciosa (MI), tumores, en el individuo que se va a inmunizar. Como consecuencia, el sistema inmunitario del individuo inmunizado se ha sensibilizado en respuesta a una amplia gama

de antígenos del VEB de la vacuna que se asemeja mucho al VEB de tipo natural, dando como resultado una modulación del sistema inmunitario que, desde el punto de vista médico, se considera muy eficaz en la lucha contra las infecciones por VEB.

5 En un modo de realización más preferente de dicho modo de realización alternativo, dicho VEB modificado difiere además del VEB de tipo natural en el hecho de que carece de los polipéptidos de VEB EBNA-2, EBNA-3a, EBNA-3b, EBNA-3c. Aún más preferente es que LMP-1 esté inhabilitado y/o que BZLF1 forme parte del VEB modificado.

10 Las partículas comprendidas en la vacuna de la invención se pueden preparar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica que implican clonación estándar y técnicas de cultivo celular y se describen, por ejemplo, en Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y., "Practical Cell Culture Techniques", Boulton et Baker (eds), Humana Press (1992), ISBN 0896032140; "Human Cell Culture Protocols", Gareth E. Jones, Humana Press (1996), ISBN 089603335X. Por ejemplo, los polipéptidos de VEB se pueden generar de manera recombinante mediante expresión a partir de secuencias de ADN dentro de células hospedadoras que permiten la agregación y la salida de las partículas. Preferentemente, la partícula se prepara mediante cualquiera de los procedimientos detallados a continuación.

15 Aunque el VEB está implicado causalmente en una variedad de afecciones médicas graves como se describe anteriormente y, a pesar de la intensa investigación y de los éxitos en cuanto a la lucha contra diferentes cepas de virus, el desarrollo de una vacuna contra el VEB ha fracasado hasta el momento, si bien en los últimos años se han aprobado vacunas de virus contra, por ejemplo, el virus del papiloma humano, así como la hepatitis B. Los presentes inventores han sido capaces de generar por primera vez una vacuna que es efectiva para preparar una respuesta inmunitaria específica para VEB en individuos sin exposición previa al VEB, así como para reactivar la respuesta inmunitaria específica para VEB en individuos infectados por el VEB y, por lo tanto, proporciona la respuesta a la necesidad persistente de una vacuna contra el VEB.

20 Lo más sorprendente es que la vacuna de la invención fue capaz de provocar una respuesta inmunitaria CD8+ específica para VEB, es decir, una respuesta inmunitaria celular además de una potente respuesta inmunitaria humoral, en un modelo animal y de reactivar los linfocitos T CD8+ específicos para VEB de donantes humanos seropositivos para VEB aunque los polipéptidos EBNA3 se habían eliminado debido a su capacidad de transformación de linfocitos B. Esto es sorprendente porque es bien sabido que las células CD8+ generadas tras una infección por VEB se dirigen predominantemente hacia polipéptidos EBNA3 y cabría esperar que una vacuna desprovista de dichos polipéptidos EBNA3 no produzca una respuesta celular CD8+ específica para VEB potente. Además, se supone que los linfocitos B humanos, que son las dianas para la vacuna contra VEB de la invención, no son capaces de presentar epítopos con restricción de clase I MHC derivados de partículas víricas (Keller et al., 2009).

25 Los inventores usaron una línea celular que porta un genoma auxiliar de VEB que se había modificado de modo que no podía empaquetarse en las partículas que forman parte de la vacuna de la invención. Para garantizar adicionalmente la seguridad de la vacuna, la vacuna está preferentemente desprovista de polipéptidos de VEB que pueden transformar linfocitos B como resultado de un genoma de VEB (auxiliar) preferentemente modificado en consecuencia en la línea celular hospedadora. Por lo tanto, incluso en el raro caso de que un genoma auxiliar de VEB se empaquetara de manera ilegítima en una partícula, la transformación de un linfocito B y la reactivación del virus se pueden excluir por completo.

30 En resumen, los inventores proporcionan partículas que están libres de ADN vírico y que inducen de manera fiable fuertes respuestas inmunitarias neutralizantes polivalentes humorales y celulares en hospedadores sin exposición previa. Por lo tanto, constituyen una vacuna eficaz y segura para individuos que presentan cualquier tipo de estado serológico, en particular, para pacientes sin exposición previa a VEB, por ejemplo, que están esperando un trasplante para reducir el riesgo de enfermedades asociadas al VEB en pacientes inmunodeprimidos.

35 En un modo de realización preferente de la vacuna de la invención, dicha partícula comprende al menos un polipéptido de VEB seleccionado entre BZLF1 y gp350 y/o comprende además al menos un polipéptido latente de VEB.

40 El polipéptido de VEB gp350 (glicoproteína 350) es una glicoproteína unida a la membrana. Dicho gp350 es responsable de la especificidad (tropismo) de los linfocitos B al unirse a CD21 en la superficie celular de los linfocitos B. Los polipéptidos víricos accesorios adicionales pueden contribuir a una infección completamente eficiente (Chesnokova et al., 2009; Omerovic et al., 2005; Silva et al., 2004; Sorem y Longnecker, 2009). Además, también se ha demostrado la infección de baja eficiencia con partículas de VEB recombinantes desprovistas de gp350 (Janz et al., 2000). Las investigaciones recientes también postulan una implicación de gp350 después de la etapa de internalización y, presumiblemente, durante la liberación de la cápside vírica desde el compartimento endosomal (Busse et al., 2010). Aunque no es crucial para la vacuna de acuerdo con la invención, resulta preferente que gp350 esté comprendida en la membrana de la partícula ya que, tras la administración de la vacuna, la respuesta inmunitaria generada se asemeja más a la respuesta inmunitaria provocada por la infección por un VEB de tipo natural.

El polipéptido temprano inmediato de VEB BZLF1 media en la interrupción de la infección latente por VEB y, en general, se considera el regulador clave en la inducción de la fase lítica del VEB. En el VEB de tipo natural, BZLF1 no se expresa constantemente. Al entrar en el cuerpo del hospedador, BZLF1 no se expresa, solo lo hace después de que se produzca la infección de los linfocitos B, dando como resultado la inducción del ciclo lítico. El ciclo lítico se mantiene hasta que la respuesta inmunitaria del hospedador se adapta al VEB y puede contener la infección, que es el momento en que el VEB entra en la fase latente de la infección. En dicha fase, BZLF1 no se expresa. La infección persistente por VEB se caracteriza por que existe una alternancia de fase lítica y fase latente, en la que la inducción de la fase lítica se debe a la expresión de BZLF1, que en esos momentos se presenta a las células inmunitarias. Por lo tanto, una vacuna que comprende BZLF1 sensibiliza el sistema inmunitario del individuo inmunizado de modo que se moviliza antes de la salida real de nuevas partículas de virus como resultado de la inducción de la fase lítica.

El término "polipéptidos latentes" se refiere a polipéptidos de VEB que están implicados en la inducción y el mantenimiento del ciclo latente del VEB y/o que se expresan como consecuencia de la inducción del ciclo latente. Preferentemente, el al menos un polipéptido latente es LMP-1 (también denominado BNLF1) y/o LMP-2.

La memoria descriptiva también divulga un procedimiento para generar una partícula, que comprende las etapas de: (a) transfección de una célula con un genoma de VEB modificado, en el que dicho genoma de VEB modificado, en comparación con un genoma de VEB de tipo natural, al menos (aa) carece de una o más secuencias que se requieren para el empaquetamiento de dicho genoma de VEB de tipo natural, carece de una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB requeridos para dicho empaquetamiento y/o comprende una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB cuya capacidad de empaquetamiento está inhabilitada; (ab) carece de una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB que se requieren para la transformación de linfocitos B y/o comprende una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB cuya capacidad de transformación de linfocitos B está inhabilitada; y (ac) carece de una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB que se requieren para inducir la replicación de un VEB y/o comprende una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB cuya capacidad para inducir la replicación de VEB está inhabilitada; (b) cultivo de la célula obtenida en la etapa (a) en condiciones que permitan la expresión de dicho genoma de VEB modificado; (c) inducción de la fase replicativa del VEB; y (d) aislamiento de dicha partícula.

El término "transfección" se usa en relación con la invención de acuerdo con el significado aceptado en la técnica, a saber, el proceso de introducción de ácidos nucleicos en las células. La transfección se puede lograr mediante una variedad de procedimientos tales como, por ejemplo, procedimientos basados en productos químicos, como la transfección mediada por fosfato de calcio o la transfección mediada por liposomas. También se conocen en la técnica procedimientos no químicos como la electroporación o la sonoporación o procedimientos basados en partículas tales como transfección mediada por cañón de genes o magnetofección, así como procedimientos mediados por virus.

El "genoma de VEB modificado" se modifica con respecto a un genoma de VEB de tipo natural. Como se describe en las secciones anteriores, existen varias cepas de VEB de tipo natural cuya configuración genética es bien conocida en la técnica (Rickinson y Kieff, 2007). Como se desprende de lo anterior, el genoma de VEB modificado se modifica únicamente con respecto a las secuencias que son comunes para todas las cepas de VEB. El término "empaquetamiento" es bien conocido en la técnica con respecto al ensamblaje del virus y se refiere al proceso de introducción del ADN vírico del VEB lineal en la partícula del virus durante el ensamblaje de la partícula del virus. El empaquetamiento del ADN genómico de VEB se inicia en las secuencias (TR) que se repiten directamente en ambos extremos de dicho ADN genómico. De forma específica, dicho genoma de VEB modificado carece de una o más secuencias que se requieren para el empaquetamiento de un genoma de VEB de tipo natural. El término "requerido para el empaquetamiento" significa, de acuerdo con la invención, que dicha una o más secuencias son esenciales en el empaquetamiento de ADN de VEB en una partícula de VEB de tipo natural. En otras palabras, en ausencia de dicha una o más secuencias, el ADN del VEB no se empaqueta en una partícula de VEB de tipo natural y una partícula generada por el procedimiento de la invención que también puede estar comprendida en la vacuna de la invención. En consecuencia, el genoma de VEB modificado no se empaqueta en una partícula como se describe en el presente documento cuando faltan dichas una o más secuencias requeridas para el empaquetamiento. Por ejemplo, las secuencias de las repeticiones terminales de VEB se pueden eliminar. Dichas repeticiones terminales son reconocidas por una enzima denominada "terminasa". De forma alternativa o adicional, se pueden eliminar una o más secuencias que codifican los polipéptidos de VEB requeridos para dicho empaquetamiento. Dichos polipéptidos de VEB son, por ejemplo, la enzima terminasa. Además, dicho polipéptido o polipéptidos de VEB requeridos para dicho empaquetamiento se pueden inhabilitar de modo que pierdan su capacidad de empaquetamiento. Dicha inhabilitación se puede lograr mediante procedimientos tales como la modificación del dominio del polipéptido que está involucrado funcionalmente en el proceso de empaquetamiento. Dicha modificación se puede lograr mediante procedimientos tales como, por ejemplo, la eliminación de dicho dominio funcional o de partes del mismo, la inhibición estérica de dicho dominio funcional o del polipéptido completo, o la sustitución de uno o más aminoácidos de dicho dominio funcional.

Aunque puede ser suficiente eliminar una secuencia requerida para el empaquetamiento o una secuencia que codifica un polipéptido de VEB requerido para dicho empaquetamiento y/o inhabilitar la capacidad de empaquetamiento de un polipéptido de VEB esencial para excluir la posibilidad de empaquetamiento, uno puede de forma alternativa inhabilitar la capacidad de empaquetamiento de una combinación de polipéptidos de VEB que

también dé como resultado la exclusión de la posibilidad de empaquetamiento del ADN de VEB.

Además, el genoma de VEB modificado carece de una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB que se requieren para la transformación de linfocitos B y/o comprende una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB cuya capacidad de transformación de linfocitos B está inhabilitada. Los polipéptidos de VEB específicos y las combinaciones de los mismos se han descrito anteriormente en el presente documento. El experto está en situación de identificar directa e inequívocamente las secuencias genómicas que codifican dicho uno o más polipéptidos. Además, está en situación de llevar a cabo las etapas que conducen a la eliminación de dicha una o más secuencias de un genoma de VEB y/o a modificar dicha una o más secuencias para obtener uno o más polipéptidos de VEB cuya capacidad de transformación se inhabilita tras la expresión.

Además, el genoma de VEB modificado carece de una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB que se requieren para inducir la replicación de un VEB y/o comprende una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB cuya capacidad para inducir la replicación de VEB está inhabilitada. Los polipéptidos de VEB que están involucrados en la replicación del VEB son principalmente polipéptidos denominados polipéptidos líticos que están involucrados en la replicación del genoma vírico, así como en la expresión del genoma del VEB, que finalmente da como resultado la salida de partículas de virus de la célula hospedadora infectada. El término "requerido para" tiene el mismo significado que se ha explicado anteriormente para otros polipéptidos, es decir, uno o más polipéptidos son absolutamente necesarios con respecto a un aspecto específico. En este aspecto de la invención, la presencia de dicha una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB es absolutamente necesaria para la inducción de la replicación de VEB. Los polipéptidos correspondientes se pueden seleccionar entre el siguiente grupo que consiste en BZLF1, BRLF1, BMLF1 y combinaciones de los mismos. También a este respecto, el experto en la técnica está en situación de identificar directa e inequívocamente las secuencias genómicas que codifican dicho uno o más polipéptidos, así como de llevar a cabo las etapas que conducen a la eliminación de dicha una o más secuencias de un genoma de VEB y/o a modificar dicha una o más secuencias para obtener uno o más polipéptidos de VEB cuya capacidad para inducir la replicación de VEB se inhabilita tras la expresión.

El término "cultivo" se usa de acuerdo con su significado aceptado en la técnica. En general, los procedimientos de cultivo celular, tales como, por ejemplo, constituyentes de medios, elección y selección de marcadores, cuantificación celular y aislamiento, son procedimientos bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en "Practical Cell Culture Techniques", Boulton et Baker. (eds), Humana Press (1992), ISBN 0896032140; "Human Cell Culture Protocols", Gareth E. Jones, Humana Press (1996), ISBN 089603335X y ejemplarmente en la sección de ejemplos. Las condiciones de cultivo varían según el tipo celular y, además, pueden dar lugar a la expresión de diferentes fenotipos para un tipo celular particular. En general, las células se cultivan y se mantienen a una temperatura y mezcla de gases apropiadas, es decir, típicamente 37 ° Celsius, 5 % de CO₂, en un medio de cultivo (a) como fluido de irrigación, transporte y dilución mientras se mantiene el equilibrio osmótico intra- y extracelular, (b) que proporciona a las células agua y ciertos iones inorgánicos a granel esenciales para el metabolismo celular normal, (c) que, junto con un carbohidrato como la glucosa, proporciona la principal fuente de energía para el metabolismo celular y (d) que proporciona un sistema tampón para mantener el medio dentro del intervalo de pH fisiológico, es decir, las células se mantienen viables. La receta de los medios de cultivo varía mucho dependiendo del tipo de célula y contiene, por ejemplo y sin limitación, factores de crecimiento, componentes nutrientes, glucosa, tampones para mantener el pH y antifúngicas y antibióticos. Los procedimientos para cultivar y mantener las células en cultivo son bien conocidos en la técnica; los medios de cultivo y otros materiales relacionados con el cultivo celular, así como las instrucciones y procedimientos para un cultivo exitoso de las células se pueden obtener, por ejemplo, en Sigma-Aldrich o Invitrogen. Las condiciones para permitir la expresión del genoma de VEB modificado corresponden esencialmente a las condiciones generales descritas anteriormente en el presente documento. Las modificaciones para potenciar la expresión de polipéptidos del genoma de VEB en la célula hospedadora son conocidas por los expertos en la técnica.

Las células que se usarán en el procedimiento de la invención son células de origen humano. Es preferente el uso de la línea celular HEK293, que se puede obtener, por ejemplo, de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig) o de la Colección de Cultivos de Tejidos Estadounidense (ATCC).

El término "inducir la fase replicativa" de VEB significa, de acuerdo con la presente invención, el inicio del proceso que finalmente conduce al ensamblaje intracelular de partículas similares a virus (PSV) y a la salida de dichas PSV como partículas definidas en el presente documento. La inducción se puede lograr, por ejemplo, complementando la célula con dicho uno o más polipéptidos de VEB que están ausentes en la célula hospedadora debido a la eliminación de dicha una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB que se requieren para inducir la replicación y/o la modificación de dicha una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB, dando como resultado su incapacidad para inducir la replicación de VEB. Dicha complementación se puede lograr, por ejemplo, proporcionando a la célula dicha una o más secuencias eliminadas, por ejemplo, en un plásmido (transfectado de forma estable o transitoria), a partir del cual se pueden expresar los polipéptidos de VEB que faltan; o proporcionando a la célula una o más secuencias no modificadas que codifican polipéptidos de VEB funcionales que son capaces de inducir la fase replicativa. La provisión de dicha una o más secuencias de ADN se puede efectuar mediante procedimientos como se describen anteriormente en el presente documento y en la sección de ejemplos. De forma alternativa, dicha complementación se puede lograr proporcionando a la célula dicho uno o más polipéptidos de VEB requeridos para inducir la replicación de un VEB. La provisión de dicho uno o más polipéptidos

a la célula se puede lograr mediante procedimientos de suministro de proteínas que son bien conocidos en la técnica y pueden implicar el uso de reactivos tales como, por ejemplo, ProteoJuice™ (Merck), TurboFect™ (Fermentas) o Lipodin-Pro™ (Abbotec).

5 La partícula o partículas generadas de este modo se pueden recoger al salir de la célula hospedadora del o como parte del sobrenadante del cultivo celular. Por ejemplo, el sobrenadante que comprende dichas partículas generadas se puede usar directamente para la infección de linfocitos B, o dichas partículas se pueden concentrar adicionalmente mediante ultracentrifugación o ultrafiltración.

10 La partícula generada de acuerdo con el procedimiento de la invención es adecuada para ser utilizada en la vacuna de la presente invención. Preferentemente, la partícula comprendida en la vacuna de la invención se genera de acuerdo con el procedimiento de la invención que puede implicar una modificación adicional del genoma de VEB con respecto a un genoma de VEB de tipo natural que el experto puede realizar fácilmente basándose en su conocimiento general común en el campo de la biotecnología, así como basándose en los procedimientos descritos y/o mencionados en el presente documento.

15 En un modo de realización preferente, un polipéptido cuya capacidad de transformación está inhabilitada en (a) la vacuna de la invención o en (ab) el procedimiento de la invención es el polipéptido LMP-1.

20 El polipéptido de VEB LMP-1 es un polipéptido que abarca la membrana que se requiere para la transformación de linfocitos B. El LMP-1 imita un receptor CD40 constitutivamente activo (Gires et al., 1997). La capacidad de transformación de linfocitos B se puede inhabilitar, por ejemplo, por truncamiento de dicho polipéptido eliminando solo la porción unida a la membrana de dicho polipéptido o partes del mismo y conservando la parte extramembranaria de dicho polipéptido en el exterior de la partícula de virus. Un procedimiento correspondiente se describe en la sección de Ejemplos. Brevemente, el LMP-1 se inactivó eliminando únicamente su región hidrófoba, es decir, los aminoácidos 26 a 210 (de SEQ ID NO.: 4) que comprenden el dominio transmembranario, mientras que, en un esfuerzo por mantener su inmunogenicidad, se conservó la parte extramembranaria. Por lo tanto, en un modo de realización preferente, el LMP-1 truncado está codificado por la secuencia de ADN de la SEQ ID NO.: 1 y
25 consiste en la secuencia de polipéptido de la SEQ ID N°: 2.

En otro modo de realización preferente de la vacuna o procedimiento de la invención, el uno o más polipéptidos de VEB requeridos para la transformación de linfocitos B que están ausentes de acuerdo con (b) de la vacuna de la invención o (ab) del procedimiento de la invención se seleccionan entre el grupo que consiste en EBNA-2, EBNA-3a, EBNA-3b y EBNA-3c.

30 En un modo de realización preferente adicional del procedimiento de la invención, el uno o más polipéptidos de VEB que se requieren para inducir la replicación de un VEB que faltan o dicho uno o más polipéptidos de VEB cuya capacidad para inducir la replicación del VEB está inhabilitada de acuerdo con el procedimiento de la invención en la etapa (ac) se seleccionan entre el grupo que consiste en BZLF1, BRLF1, BMLF1 y cualquier combinación de los mismos y en el que en la etapa (c) de dicho procedimiento de la invención se induce la fase replicativa proporcionando a dicha célula el polipéptido o polipéptidos seleccionados.
35

En un modo de realización preferente del procedimiento de la invención, el polipéptido seleccionado es BZLF1.

En un modo de realización aún más preferente del procedimiento de la invención, dicha provisión de dicho uno o más polipéptidos de VEB o dicho BZLF1 a dicha célula se efectúa mediante la expresión de dicho uno o más polipéptidos de VEB o dicho BZLF1 de un vector transfectado de manera estable en dicha célula.

40 Si bien existen varios procedimientos para proporcionar a la célula dicho uno o más polipéptidos de VEB o dicho BZLF1 como se describió anteriormente, la expresión de un plásmido integrado de manera estable es ventajosa por varias razones. Los niveles de expresión del polipéptido o polipéptidos expresados son consistentes, la modulación de la célula hospedadora se reduce al mínimo y la complejidad técnica de producir dichas partículas se minimiza igualmente de manera significativa, lo que en el caso de sistemas de producción a gran escala es ventajoso.

45 En un modo de realización más preferente del procedimiento de la invención, la expresión de dicho uno o más polipéptidos de VEB o dicho BZLF1 se regula de manera inducible.

50 Las técnicas para controlar la expresión de polipéptidos a partir de un plásmido son bien conocidas en la técnica. Una técnica implica el uso de promotores inducibles tales como calor, productos químicos o promotores fotosensibles. Por ejemplo, los promotores inducibles por tetraciclina, promotores inducibles por Dox, promotores inducibles por ecdisona o promotores inducibles por metales pesados son conocidos en la técnica y se pueden usar de acuerdo con la invención (véase, por ejemplo, la Fig. 7). Promotores adecuados adicionales son bien conocidos por el experto en la técnica. De forma alternativa, BZLF1 también se puede regular cuando se fusiona con el receptor de estrógeno y, por lo tanto, se activa con la adición de estrógeno.

55 En otro modo de realización preferente del procedimiento de la invención, dicho procedimiento comprende, después de la etapa (b) y antes de la etapa (c), una etapa adicional (b') que comprende: proporcionar uno o más polipéptidos víricos o no víricos, una o más secuencias de ácidos nucleicos víricos o no víricos y/o uno o más adyuvantes de

vacunas a dicha célula, en la que dicho uno o más polipéptidos víricos o dicha una o más secuencias de ácidos nucleicos víricos no son polipéptidos de VEB o secuencias de ácidos nucleicos de VEB, respectivamente.

5 El uno o más polipéptidos víricos o no víricos y la una o más secuencias de ácidos nucleicos víricos o no víricos pueden ser de cualquier origen o secuencia siempre que no sean polipéptidos de VEB o secuencias de ácidos nucleicos de VEB de acuerdo con la definición dada anteriormente en el presente documento. Preferentemente, dicho uno o más polipéptidos o dicha una o más secuencias de ácidos nucleicos son polipéptidos o secuencias que son inmunogénicos, es decir, provocan una respuesta inmunitaria específica, y, más preferentemente, se ha demostrado que son seguros y eficaces como agente inmunizante.

10 El término "adyuvante" se usa de acuerdo con el significado bien conocido en relación con las vacunas. De forma específica, un adyuvante es un agente inmunológico que modifica, preferentemente potencia, el efecto de una vacuna mientras tiene pocos o ningún efecto directo sobre el sistema inmunitario cuando se administra *per se*. De acuerdo con la presente invención, se define como cualquier sustancia que sea capaz de acelerar, prolongar o potenciar respuestas inmunitarias específicas para antígeno cuando se usa en combinación con antígenos específicos. Los adyuvantes adecuados pueden ser adyuvantes inorgánicos tales como, por ejemplo, sales de aluminio (por ejemplo, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio), adyuvantes orgánicos tales como escualeno o adyuvantes basados en aceite, así como virosomas.

20 Este modo de realización se debe al hecho de que la partícula generada de acuerdo con la invención puede abarcar de manera eficaz otros polipéptidos además de los polipéptidos de VEB así como las secuencias de ácidos nucleicos y, por lo tanto, además de ser una vacuna, actúa como herramienta de suministro para el suministro de compuestos adicionales al individuo que se va a inmunizar. La incorporación de dicho uno o más polipéptidos víricos o no víricos, una o más secuencias de ácidos nucleicos víricos o no víricos y/o uno o más adyuvantes de vacuna se puede lograr convenientemente mediante la provisión de este último a la célula de acuerdo con las técnicas anteriormente descritas, tales como la transfección de proteínas o la transfección de ácidos nucleicos en cantidades que sean adecuadas para dicha incorporación. Las cantidades específicas requeridas, así como la técnica específica para alcanzar dichos niveles intracelulares, pueden ser determinadas experimentalmente por el experto sin una carga excesiva.

30 En un modo de realización preferente de la vacuna de la invención, comprende adicionalmente uno o más polipéptidos víricos o no víricos, una o más secuencias de ácidos nucleicos víricos o no víricos y/o adyuvantes de vacunas, en el que dicho uno o más polipéptidos víricos o dicha una o más secuencias de ácidos nucleicos víricos no son polipéptidos de VEB o secuencias de ácidos nucleicos de VEB, respectivamente.

35 Las definiciones dadas anteriormente se aplican también a este modo de realización y los procedimientos para generar dichas partículas se han descrito igualmente anteriormente. Preferentemente, dicha partícula tal como está comprendida en la vacuna comprende uno o más polipéptidos víricos o no víricos, una o más secuencias de ácidos nucleicos víricos o no víricos y/o adyuvantes de vacunas que forman parte de la partícula. No obstante, también se prevé que dicha vacuna comprenda uno o más polipéptidos víricos o no víricos, una o más secuencias de ácidos nucleicos víricos o no víricos y/o adyuvantes de vacunas que se mezclen con las partículas definidas en el presente documento sin ser incorporadas en dichas partículas.

Otro modo de realización de la invención se refiere a una célula obtenida por transfección de acuerdo con la etapa (a) del procedimiento de acuerdo con la invención.

40 Como entenderá el experto en la técnica y como se describe anteriormente, la transfección estable de un vector que permite la expresión preferentemente regulada de forma inducible de dicho uno o más polipéptidos de VEB o dicho BZLF1 es particularmente útil en configuraciones a gran escala y/o configuraciones que requieren un producto que esté estandarizado y sea consistente en cuanto a su calidad. Esto es posiblemente importante para los productos que están destinados a un uso médico, específicamente para la administración a pacientes, tales como la partícula generada de acuerdo con el procedimiento de la invención que, preferentemente, forma parte de la vacuna de la invención. Preferentemente, la célula es una célula en cultivo, una línea celular o una célula *in vitro*.

La memoria descriptiva también divulga un kit que comprende una vacuna de acuerdo con la invención o una partícula generada de acuerdo con el procedimiento de la invención.

50 El kit puede comprender solo un tipo de un elemento tal como la vacuna de la invención o una partícula generada de acuerdo con el procedimiento. También puede comprender los diversos componentes que constituyen una vacuna de acuerdo con la invención.

En un modo de realización preferente, la partícula y los vehículos farmacéuticamente aceptables que constituyen una vacuna están comprendidos en un kit de acuerdo con la invención como componentes separados.

55 En otro modo de realización preferente, la célula obtenida de acuerdo con el procedimiento de la invención y el compuesto o compuestos requeridos para inducir la fase replicativa están comprendidos en un kit de acuerdo con la invención como componentes separados. En consecuencia, los diversos componentes del kit se pueden envasar en uno o más recipientes tales como uno o más viales. Los viales pueden contener, además de los componentes,

conservantes o tampones para almacenamiento, medios para mantenimiento y almacenamiento, por ejemplo, medios celulares, DMEM, MEM, HBSS, PBS, HEPES, higromicina, puromicina, solución de penicilina-estreptomicina, gentamicina, entre otros. De manera ventajosa, el kit comprende además instrucciones sobre el uso de los componentes que permiten al experto trabajar de manera conveniente, por ejemplo, diversos modos de realización de la invención. Cualquiera de los componentes puede ser empleado en un entorno experimental. Por ejemplo, la partícula *per se* o la vacuna se pueden usar para estudiar la respuesta inmunitaria en estudios en animales así como en estudios en humanos.

Además, la invención se refiere al uso de una vacuna de acuerdo con la invención o una partícula obtenida por el procedimiento de la invención para generar linfocitos T CD8+ específicos para un antígeno de VEB.

El uso de acuerdo con la invención se puede implementar, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento descrito a continuación.

Adicionalmente, la invención se refiere a un procedimiento para generar una preparación que contiene linfocitos T CD8+ específicos para un antígeno de VEB, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) incubación de linfocitos B con una vacuna de acuerdo con la invención o una partícula obtenida mediante el procedimiento de la invención durante un período de tiempo suficiente para generar una preparación que contiene linfocitos B que presentan antígenos de VEB; (b) mezclado de dichos linfocitos B obtenidos en la etapa (a) con una preparación que comprende linfocitos T; y (c) incubación de dicha mezcla obtenida en la etapa (b) para generar una preparación que incluya linfocitos T CD8+ específicos para un antígeno de VEB.

El término linfocitos T CD8+ se puede usar indistintamente con el término linfocitos T citotóxicos que también es bien conocido en la técnica.

El término "incubar" se refiere, de acuerdo con este modo de realización, al proceso de poner en contacto diferentes entidades. Con respecto a la incubación de linfocitos B con una vacuna de la invención o una partícula obtenida mediante el procedimiento de la invención, dicha incubación se realiza durante un período de tiempo específico en condiciones que mantienen los linfocitos B viables y reactivos a antígenos tales como dicha vacuna o partícula. El período de tiempo necesario para la presentación de antígenos por parte de los linfocitos B se puede determinar experimentalmente y puede variar dependiendo de la configuración experimental elegida. Preferentemente, la incubación se mantiene durante al menos (para cada valor) 2, 4, 6, 8, 16 o al menos 24 horas. También se prevén tiempos de incubación de al menos 2, al menos 3 o al menos 4 días.

La preparación de linfocitos T que se mezclan con los linfocitos B en la etapa (b) comprende linfocitos T indiferenciados y/o linfocitos T de memoria específicos para VEB y/o linfocitos T efectores específicos para VEB. La etapa de incubación (c) del procedimiento de la invención debe permitir la generación de linfocitos T CD8+ específicos para VEB durante un período de tiempo. Dicho período de tiempo necesario para el desarrollo de linfocitos T CD8+ se puede determinar experimentalmente y puede variar dependiendo de la configuración experimental elegida. Preferentemente, la incubación se mantiene durante al menos (para cada valor) 2, 4, 6, 8, 16 o al menos 24 horas. También se prevén tiempos de incubación de al menos 2, al menos 3 o al menos 4 días.

El procedimiento o el uso puede ser un procedimiento o uso *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

Este modo de realización de la invención se debe al sorprendente hallazgo de que, contrariamente a un dogma bien establecido en la técnica (por ejemplo, Keller et al., 2009; WO 2009/068615), los linfocitos B son capaces de presentación cruzada y sensibilización cruzada. De forma específica, la sensibilización cruzada describe el proceso mediante el cual, después de la captación por una célula inmunitaria, un antígeno se procesa para la presentación asociada al MHC de clase I y MHC de clase II. Se creía previamente que dicho proceso estaba restringido a, por ejemplo, células dendríticas y macrófagos. Mientras que la presentación de antígenos asociada al MHC de clase II da como resultado la generación de linfocitos T CD4+, la presentación de antígenos asociada a MHC de clase I da como resultado la generación de células CD8+, es decir, linfocitos T citotóxicos específicos para antígeno. Se cree que los linfocitos B son incapaces de experimentar sensibilización cruzada, siendo su función principal la generación de anticuerpos. Los inventores de la presente invención podrían mostrar sorprendentemente que, tras la administración a ratones de una partícula como se describe en el presente documento, la presencia de linfocitos T específicos para VEB se podría mostrar en esplenocitos (véase, por ejemplo, Ejemplo 4, Figura 5, Ejemplo 8, Fig. 11C).

Las figuras muestran:

Figura 1: El genoma auxiliar de células 293-VII+ contiene varias eliminaciones (representadas por los triángulos). Los genes latentes EBNA-2, EBNA-3a, -3b y -3c se eliminaron por completo. LMP-1, que se ha descrito que está presente en partículas de virus, se inactivó funcionalmente mediante la eliminación del dominio transmembranario. También se eliminó BZLF-1, que activa los ciclos líticos y las señales de empaquetamiento (TR). Para la propagación en *E. coli*, el genoma contiene un replicón del factor F. La GFP potenciada se ha insertado como un gen marcador y el gen de resistencia a la higromicina permite la selección en células eucariotas. La estrategia de clonación se ha descrito previamente con más detalles (Hettich et al., 2006; Delecluse et al., 1998; Delecluse et al., 1999). El genoma auxiliar de células 293-VII+ representa un modo de realización del genoma de VEB modificado

detallado en la presente memoria descriptiva.

Figura 2: Las partículas de virus generadas, denominadas PSV VII+ (que corresponden a la partícula descrita en esta memoria descriptiva) están libres de cantidades detectables de ADN de VEB. Las partículas liberadas de líneas celulares de empaquetamiento VII+ inducidas se aislaron del sobrenadante como se describe y se analizaron mediante PCR para determinar la presencia de ADN vírico. De forma paralela, las partículas de virus se aislaron de células 2089 inducidas, que liberan viriones infecciosos tras la inducción de la fase productiva. No se detectó ADN de VEB en las PSV VII+, en contraste con partículas 2089. Los ADN víricos que transportan el gen para potenciar la GFP se detectaron con cebadores específicos para gfp.

Figura 3A: Las PSV VII+ se unen exclusivamente a células CD21+. Con el fin de probar el tropismo de linfocitos B de las PSV VII+, se incubaron células PBMC de un donante sano con PSV VII+ durante la noche. La unión de las PSV VII+, como se revela por la transferencia de GFP, fue detectable exclusivamente en células CD21+.

Figura 3B: Las PSV VII+ se unen exclusivamente a células CD21+. Con el fin de investigar con más detalle la interacción de las PSV con los linfocitos B, se realizó una microscopía confocal en células PBMC incubadas con PSV que reveló claramente una colocalización de gp350, presente en las PSV VII+, y de CD21 en la superficie celular, indicativo de una interacción directa de estas dos moléculas.

Figura 4: Las PSV VII+ inducen anticuerpos neutralizantes en ratones no sometidos previamente a experimentación. Ratones BALB/c (n = 4) fueron inmunizados dos veces con 10 µg de PSV VII+ (barras gris oscuro) o con las mismas cantidades de exosomas de células 293 (n = 2) (barras gris claro). Se aisló sangre 4 semanas después de la segunda inmunización y se analizó la presencia de anticuerpos específicos para VEB. **(izquierda)** Los ratones inmunizados con PSV VII+, pero no los inmunizados con exosomas de células 293, presentaban niveles elevados de anticuerpos específicos para varias proteínas de VEB. Las células 293 se transfectaron con un plásmido de expresión para la proteína vírica de interés y se lisaron un día después. A continuación, se cubrió una placa de 96 pocillos con los diferentes lisados, se lavó y se incubó con suero de ratón a una dilución de 1:200. La presencia de anticuerpos unidos se detectó con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa. Se usaron células 293 transfectadas con un plásmido de expresión para la proteína de CMV pp65 como control. **(derecha)** Los anticuerpos inducidos específicos para VEB neutralizan e inhiben la infección de los linfocitos B primarios. Las partículas de VEB infecciosas recombinantes (VEB-2089) se preincubaron durante 30 minutos con sueros de ratones inmunizados con PSV VII+ (n = 2) o con exosomas de células 293 (n = 1) y luego se usaron para infectar linfocitos B primarios humano. células a una MOI de 0,1. 48 horas más tarde, el número de células infectadas, según lo revelado por la expresión de GFP, se midió mediante citometría de flujo. Quedó claro que las partículas de células 293 por sí solas tienen un pequeño efecto inhibitorio, lo que probablemente se deba a la inducción de anticuerpos específicos para células 293 y a que el VEB-2089 también se deriva de células 293. Sin embargo, la inhibición por el suero de ratones inmunizados con PSV VII+ fue significativamente más fuerte y bloqueó la infección casi por completo.

Figura 5: Las PSV VII+ inducen la generación de linfocitos T específicos para VEB. Se inmunizaron ratones BALB/c inmunocompetentes dos veces con PSV VII+ (10 µg, i.p.) y los bazo se aislaron y analizaron 4 semanas después de la segunda inmunización. La presencia de linfocitos T específicos para VEB se midió en un ensayo ELISPOT de interferón gamma específico para ratones usando esplenocitos irradiados que se habían cargado con lisados de células 293, transfectadas transitoriamente con plásmidos de expresión para cualquiera de las proteínas de VEB indicadas. Este ensayo Elispot reveló respuestas inmunitarias celulares específicas contra los polipéptidos de VEB, todos los cuales se han descrito como contenidos en el VEB de tipo natural (Johannsen et al, 2004). Por el contrario, no se detectaron respuestas inmunitarias contra EBNA2 ni pp65, un polipéptido derivado de citomegalovirus, lo que demuestra la especificidad del ensayo.

Figura 6: Reactivación de linfocitos T CD4+ y CD8+ de donantes positivos para VEB. Las células PBMC de dos donantes se estimularon tres veces en ocho días con PSV VII+ o exosomas de células 293 que no contienen ninguna proteína derivada de VEB. Las células se contaron y analizaron mediante citometría de flujo 12 días después de la primera estimulación.

Figura 7: Activación condicional de la fase lítica del VEB en células 293-VII+. Un derivado de la línea celular 293-VII+ permite la producción continua de PSV. (A) Mapa de plásmido del plásmido p3989, que se introdujo en la línea celular 293-VII+. Este plásmido de expresión contiene los genes de expresión temprana inmediata del ciclo lítico del VEB, BZLF1 y BRLF1, bajo el control de un promotor bidireccional inducible por tetraciclina junto con genes reguladores (terR B/E-KRAB y rTA2s-M2), el origen de replicación del ADN del plásmido, oriP, y su transactivador EBNA1 (Bornkamm, et al., 2005). El plásmido p3989 se basa en un principio descrito anteriormente (Urlinger et al., 2000; Forster et al., 1999). La expresión dependiente de tetraciclina de las proteínas activadoras de la fase lítica del VEB, BZLF1 y BRLF1, se consigue a partir de un promotor bidireccional regulado por tetraciclina. Este sistema de expresión condicional se basa en la expresión constitutiva de un casete de expresión bicistrónico que codifica el transactivador controlado con tetraciclina, rTA2S-M2, y la proteína de fusión represor Tet-KRAB (tTS-KRAB). El promotor bidireccional que impulsa los genes de interés se regula negativamente a través del represor tTS-KRAB en ausencia de doxiciclina, pero se induce tras su adición por el activador rTA2S-M2. (B) El análisis de inmunoelctrotransferencia indicó la expresión inducida de BZLF1 y BRLF1 en células 293-VII+ con p3989 doce

horas después de la adición de doxiciclina. (C) Células PBMC de un donante VEB-seropositivo se cargaron con PSV de células 293-VII+-p3989 inducidas con doxiciclina y se usaron como estimuladores para un clon de linfocitos T CD4+ específicos para gp350. La liberación de IFN- indicó que las PSV generadas a partir de células 293-VII+ y 293-VII+-p3989 eran comparables. Las PBMC descargadas (w/o) o las PBMC cargadas con exosomas de células HEK293 (exo) sirvieron como controles negativos, un LCL autólogo fue el control positivo.

Figura 8: Los linfocitos B cargados con PSV reactivan eficientemente un clon de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos para VEB: (A) Los linfocitos B cargados con PSV son potentes estimuladores de un clon de linfocitos T CD4+ específicos para B NRF1. Una línea mini-LCL (Moosmann et al., 2002) se cargó con diluciones sucesivas de las PSV obtenidas de células 293-VII+ inducidas líticamente. Las células cargadas se usaron como estimuladores para un clon de linfocitos T CD4+ autólogo, que reconoce un epítipo específico para B NRF1 (Mautner et al., 2004). La estimulación del clon de linfocitos T con la línea mini-LCL cargada con exosomas (exo) de células HEK293 se usó como control negativo y se utilizó un LCL autólogo que expresa B NRF1 como control positivo. (B) Las células PBMC de un donante HLA-A2+ / B35+ se incubaron con PSV de células 293-VII+ durante la noche o no se trataron y luego se usaron como estimuladores para clones de linfocitos T CD8+ histocompatibles específicos para las proteínas de VEB BZLF1 (EPL, (Green et al., 2004)) y BRLF1 (YVL; (Saulquin et al., 2000)). Un ELISA de IFN- γ reveló una activación débil pero evidente de los linfocitos T incubados con PBMC tratadas con PSV, pero no con PBMC sin tratar.

Figura 9: La reactivación con PSV de los linfocitos T específicos para VEB depende de los linfocitos B CD19+. Los linfocitos T CD3+ de un donante sano se estimularon tres veces en un período de 14 días con células estimuladoras autólogas irradiadas letalmente como se indicó, que se habían preincubado con exosomas (exo) o con PSV de células HEK293 o células 293-VII+ durante la noche. Las células estimuladoras eran PBMC no fraccionadas, linfocitos B CD19+ clasificadas por MACS o PBMC de las que se habían agotado los linfocitos B (CD19-). Después de tres rondas de estimulación, se evaluó la reactivación de linfocitos T específicas para VEB en un ensayo Elispot de IFN- γ , utilizando PBMC autólogas cargadas con PSV o exosomas como diana. La reactivación de los linfocitos T dependía estrictamente de la presencia de linfocitos B CD19+ como estimuladores.

Figura 10: Las PSV de células 293-VII+ aumentan selectivamente los linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos para VEB. Las PBMC de diferentes donantes positivos para VEB se irradiaron letalmente, se cargaron con PSV de células 293-VII+ inducidas líticamente, con exosomas de células HEK293 o se dejaron sin tratar y se usaron como estimuladores para PBMC autólogas. Después de 28 días y tres rondas de estimulación, las células se analizaron mediante FACS. (A) Las PBMC PSV-, pero no las PBMC irradiadas cargadas con exosomas (exo) o las no tratadas (w/o) aumentaron los linfocitos CD4+ como se describió recientemente (Adhikary et al., 2008). (B) Las PBMC cargadas con PSV reactivaron y aumentaron los linfocitos T CD8+ específicos para VEB, como se revela por la tinción con tetrámeros/pentámeros HLA B03/B08 o A02 restringidos para epítipos seleccionados de las proteínas de VEB. Un tetrámero (KIF) para la proteína celular Her2/neu sirvió como control negativo. (C) Las PBMC irradiadas cargadas con PSV aumentaron de forma fiable los linfocitos CD8+ específicos para VEB de cuatro donantes diferentes hasta 15 veces en 28 días, mientras que el número total de linfocitos T CD8+ disminuyó en aproximadamente la mitad en comparación con el número inicial de linfocitos T CD8+.

Figura 11: Las PSV provocan respuestas inmunitarias humorales y celulares específicas para VEB en ratones inmunizados. Ratones BALB/c fueron inmunizados dos veces con 10 μ g de PSV de células 293-VII+ (n = 4) o con las mismas cantidades de exosomas de células HEK293 (n = 2). Los sueros y los esplenocitos se analizaron cuatro semanas después de la última inmunización. (A) En ELISA, los sueros de los ratones PSV- (barras negras) pero no los de los ratones inmunizados con exosomas (barras grises) contienen anticuerpos específicos para proteínas de VEB presentes en viriones. (B) Los anticuerpos generados en ratones inmunizados con PSV de células 293-VII+ neutralizan el VEB infeccioso. Las reservas de VEB 2098 positivos para GFP se preincubaron durante 30 minutos con sueros de ratones inmunizados con PSV (PSV) o exosomas (exo) y posteriormente se usaron para infectar linfocitos B primarios humanos a una multiplicidad calculada de infección de 0,1. 48 horas después, se determinó el número de células infectadas que expresaban GFP mediante citometría de flujo. El anticuerpo neutralizante anti-gp350 72A1 se usó como un control positivo a dos concentraciones diferentes. (C) Las PSV de las células 293-VII+ activan los linfocitos T específicos para VEB. La presencia de linfocitos T específicos para VEB en ratones inmunizados con PSV (barras negras) o exosomas (barras grises) se midió en un ensayo Elispot de IFN- γ específico para ratones con esplenocitos irradiados como células presentadoras de antígeno cargadas con lisados de células HEK293, que habían sido transfectadas transitoriamente con plásmidos de expresión que codifican las proteínas víricas indicadas.

Los ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1: Las células 293-VII+ liberan PSV tras la inducción que carecen de ADN vírico pero contienen varias proteínas de VEB

Los inventores describieron recientemente la construcción de dos líneas celulares auxiliares para la encapsidación de vectores derivados de VEB en partículas de virus recombinantes (Delecluse et al., 1999; Hettich et al., 2006). Estas líneas celulares albergan genomas auxiliares de VEB que carecen de las repeticiones terminales (TR), las señales de empaquetamiento de los virus, pero contienen genes para *gfp*. Consecuentemente, estos genomas

auxiliares no se pueden encapsidar en partículas víricas, sino que liberan *en trans* todas las proteínas necesarias para el empaquetamiento de vectores víricos adecuados y el ensamblaje y liberación de partículas de VEB recombinantes e infecciosas. La línea celular de primera generación, TR-2, albergaba un genoma de VEB intacto que conservaba la capacidad de transformación completa de los linfocitos B humanos primarios (Delecluse et al., 1999). Para hacer frente a la rara encapsidación ilegítima del genoma auxiliar y a la recombinación accidental entre vectores víricos y el genoma auxiliar que da como resultado la liberación de partículas de virus recombinantes con capacidad de transformación, los inventores diseñaron posteriormente una línea celular de empaquetamiento de segunda generación, 293-VII+, con un genoma auxiliar de VEB que carece de la mayoría de los genes víricos esenciales para la transformación de linfocitos B (Figura 1) (Hettich et al., 2006).

Sorprendentemente, las partículas víricas recombinantes liberadas a partir de estas líneas celulares auxiliares mantienen las propiedades del VEB de tipo natural: muestran un tropismo por linfocitos B y una capacidad de transducción para los linfocitos B normales y malignos. Probablemente debido a su sobreexpresión a partir del genoma auxiliar, estas partículas también contienen la proteína GFP, por lo que su interacción con las células diana se puede monitorizar fácilmente. Curiosamente, los inventores observaron que, tras la inducción del ciclo lítico con un plásmido de expresión de BZLF1, p509 (Hammerschmidt y Sugden, 1988), las células 293-VII+ liberaron grandes cantidades de partículas positivas a GFP en el sobrenadante, incluso cuando no había sido cotransfectado un vector vírico empaquetable. Dado que muchos tipos de células y líneas celulares permanentes liberan constitutivamente microvesículas llamadas exosomas y que muchos virus explotan la biogénesis de los exosomas para su propio ensamblaje y salida (Calistri et al., 2009; Mori et al., 2008; Pelchen-Matthews et al., 2004), se preguntaron si las partículas liberadas a partir de células 293-VII+ tras la inducción del ciclo productivo son partículas similares a exosomas que contienen proteínas víricas.

Por lo tanto, los inventores analizaron la composición y las propiedades de estas partículas con más detalle. En primer lugar, verificaron mediante PCR si las PSV de las células VII+ contenían ADN vírico. Para ello, indujeron la fase lítica del VEB en células VII+ con p509 y, como control positivo, también en células 2089 que albergan un genoma de VEB TR+ y liberan partículas de virus infecciosas (Delecluse et al., 1998). Tres días después, se extrajeron los sobrenadantes de estas líneas celulares y se precipitaron las partículas liberadas mediante ultracentrifugación. Un análisis por PCR de estas partículas reveló que el ADN del VEB se podía detectar fácilmente en la partícula 2089, pero no en las PSV de las células VII+ (Fig. 2).

Ejemplo 2: Las PSV de 293-VII+ tienen un tropismo por linfocitos B de tipo VEB

Una de las proteínas que se encontraron incorporadas en las PSV fue gp350/220, la principal proteína de la envoltura vírica que media en la unión del virión a los linfocitos B humanos al interactuar con CD21. Los inventores, por lo tanto, quisieron dilucidar si las PSV tienen un tropismo por linfocitos B similar al VEB de tipo natural. Para ello, incubaron PBMC recién aisladas durante la noche con PSV VII+ concentradas y analizaron la unión de las PSV por FACS. Para estos experimentos, aprovecharon el hecho de que la GFP mejorada, expresada a partir del genoma auxiliar VII+, también se incorpora a las PSV. Como se demuestra en la Figura 3a, la unión de las PSV está restringida a las células CD21+, muy probablemente a los linfocitos B, a juzgar por el hecho de que solo las células CD21+ se vuelven positivas a GFP. Por el contrario, no se pudo observar la unión de las PSV a células CD21- negativas. Con el fin de investigar con más detalle la interacción de las PSV con los linfocitos B, los inventores realizaron una microscopía confocal en células PBMC incubadas con PSV que reveló claramente una colocalización de gp350, presente en las PSV, y CD21 en la superficie celular, indicativo de una interacción directa de estas dos moléculas (Figura 3b).

Se ha descrito recientemente que las PSV derivadas de células 293/TR- pueden reactivar eficientemente linfocitos T CD4+ específicos para VEB al ser absorbidas por PBMC humanas (Adhikary et al., 2008), por lo que se buscó determinar si esto también es cierto para las PSV VII+. Para abordar esta cuestión, los inventores cargaron PBMC primarias irradiadas procedentes de un donante sano con PSV VII+ y luego las cocultivaron con clones autólogos de linfocitos T CD4+ específicos para las proteínas estructurales de VEB BLLF1 y BNRF1 o con PBMC autólogas. Estos experimentos demostraron que las PBMC cargadas con PSV VII+ reactivaron eficazmente clones específicos de linfocitos T CD4+ y linfocitos T a granel autólogos, medidas con un ensayo ELISA de IFN- γ .

Ejemplo 3: Las PSV VII+ inducen anticuerpos neutralizantes específicos para VEB en hospedadores no sometidos previamente a experimentación

Los resultados de las secciones anteriores demostraron el potencial de las PSV para estimular las respuestas inmunitarias de recuerdo específicas para VEB. En una serie de experimentos posterior, los inventores evaluaron si las PSV también pueden inducir respuestas inmunitarias *in vivo* específicas para VEB en hospedadores no sometidos previamente a experimentación, lo que por supuesto es un requisito previo para las vacunas profilácticas. Para ese propósito, los inventores vacunaron por vía intraperitoneal a ratones BALB/c dos veces en un período de 14 días con 10 μ g de PSV ($n = 4$), mientras que los ratones de control ($n = 2$) fueron inmunizados con la misma cantidad de exosomas aislados de sobrenadantes de células 293. Cuatro semanas después de la segunda inmunización, se recogieron y analizaron los sueros para determinar la presencia de anticuerpos específicos para VEB y se analizaron los esplenocitos para determinar la especificidad por VEB. Para ello, los inventores recubrieron placas agrupadas de 96 pocillos con una serie de lisados de células HEK293 que habían sido transfectadas

transitoriamente con plásmidos de expresión para diversas proteínas de VEB.

Como se muestra en la Figura 4, los sueros de ratones inmunizados con PSV VII+, pero no de ratones inmunizados con exosomas de células 293, revelaron una fuerte inmunorreactividad y, por lo tanto, la inducción de anticuerpos específicos para varias proteínas de VEB que se han identificado recientemente como componentes de partículas de VEB (Johannsen et al., 2004). Todos los anticuerpos fueron detectables inequívocamente en sueros de ratones inmunizados con PSV a diluciones 1:200 (Figura 4) y 1:1000 (no mostrado). De interés, los inventores también detectaron anticuerpos contra el factor de transcripción BZLF-1, que, como se mencionó anteriormente, está presente en altos niveles en células VII+ liberadoras de PSV y se incorpora en PSV VII+. Por el contrario, los ratones inmunizados con exosomas de células 293 revelaron niveles no detectables de anticuerpos específicos contra VEB. Como control, los inventores midieron las reactividades de los sueros frente a lisados de células 293 transfectadas con plásmidos de expresión que codifican la proteína de tegumento principal de CMV, pp65 y el transactivador de VEB, EBNA2. Esta proteína se traduce desde el marco de lectura abierto BYRF1, que se ha eliminado del genoma auxiliar VII+ (ver Figura 1). Los inventores no pudieron detectar ninguna reactividad contra estas dos proteínas, indicativo de la especificidad de estos ensayos. De interés, cantidades significativas de títulos de anticuerpos en ratones a los que se les inyectaron PSV ya eran detectables siete días después de la primera inmunización, indicativos de la alta inmunogenicidad de las PSV VII+ (datos no mostrados).

Para evaluar si los anticuerpos específicos contra VEB son neutralizantes, los inventores cuantificaron en qué medida inhiben la infección de linfocitos B primarios por VEB. Para ello, hicieron uso de un VEB recombinante (2089) que porta el gen *gfp* que se expresa en células infectadas. (Delecluse et al., 1998). Los linfocitos B primarios aislados de adenoides frescas se infectaron con VEB-2089, se preincubaron con sueros de ratón durante 30 minutos, a una MOI de 0,1 y se cuantificó el número de células infectadas 48 horas después mediante análisis FACS. Como se muestra en la Figura 4, los sueros de ratones infectados con PSV inhibieron la infección de linfocitos B humanos primarios por VEB. Como se puede observar, los sueros de ratones inmunizados con células 293 también tienen un efecto inhibidor débil que probablemente se debe a anticuerpos específicos contra 293 que reconocen el VEB-2089 derivado de células 293.

Ejemplo 4: Las PSV VII+ inducen respuestas inmunitarias celulares específicas para VEB

Los inventores se preguntaron a continuación si la inmunización con PSV de ratones no sometidos a experimentación previa también inducía respuestas inmunitarias celulares específicas para VEB, que se sabe que son esenciales para la vigilancia inmunológica del virus y de las células infectadas por VEB (Hislop et al., 2007). Por lo tanto, aislaron los bazo de ratones inmunizados con PSV y generaron una suspensión de células individuales. Se incubaron 2×10^5 esplenocitos durante la noche con lisados de células 293 que habían sido transfectadas transitoriamente con plásmidos de expresión para cualquiera de esas proteínas de VEB que también se han usado para la detección de anticuerpos específicos contra VEB para permitir la absorción, la degradación proteolítica y la presentación de proteínas derivadas de PSV. La activación de los linfocitos T se midió 24 horas después con un ensayo Elispot de interferón-gamma.

Ejemplo 5: Introducción de una línea celular de empaquetado de 3ª generación

Las líneas celulares TR-2 y 293-VII+ son dos líneas celulares de empaquetamiento en las que el ciclo de vida productivo del VEB es inducido por transfección transitoria de un plásmido de expresión que codifica BZLF1, que es suficiente para iniciar el cambio del ciclo latente al ciclo lítico. Sin embargo, la producción a gran escala de PSV de grado clínico depende de una línea celular que se libere permanentemente.

Para superar estas restricciones y dar las primeras pasos hacia una producción estandarizada y más constante de PSV, los inventores diseñaron una nueva línea celular de empaquetamiento, denominada iVII+, que, además del genoma auxiliar VII+, porta de manera estable un segundo plásmido que codifica un BZLF1 inducible y, además, BRLF1, que es otra proteína vírica temprana inmediata que, en cooperación con BZLF1, induce el ciclo lítico en células epiteliales (Zalani et al., 1996). Cuando se cultivan en presencia de doxiciclina, las células iVII mantienen el ciclo lítico y liberan PSV constitutivamente sin ningún cambio detectable en el fenotipo celular.

Ejemplo 6: Reactivación de linfocitos T específicos para VEB

Con el fin de definir si las PSV obtenidas de células 293-VII+ son absorbidas por linfocitos B humanos y si tienen el potencial de reactivar linfocitos T específicos para VEB, una línea de linfocitos B linfoblásticos (LCL) transformada con un mini-VEB (Kempkes et al., 1995) se incubó con PSV de células 293-VII+. A continuación, los LCL cargados se cocultivaron con un clon de linfocitos T CD4+ autólogo específico para la proteína del tegumento del VEB BNRF1 no codificado en los mini-VEB (Kempkes et al., 1995). Los experimentos demostraron que los linfocitos B cargados con PSV reactivaron eficazmente el clon de linfocitos T CD4+, según se midió mediante un ensayo ELISA de GM-CSF (Fig. 8A). Este conjunto de experimentos muestra que las PSV de células 293-VII+ interactúan específicamente con linfocitos B humanos y son absorbidos por ellos, que a su vez son potentes células presentadoras de antígeno y estimuladores de linfocitos T CD4+ específicos para VEB, corroborando los hallazgos de Adhikary et al., 2008.

Ejemplo 7: Las PSV reactivan los linfocitos T CD8+ de hospedadores seropositivos

La eficacia de las vacunas depende de la generación de una memoria inmunológica de larga duración, que se basa en los linfocitos T CD4+ y CD8+. Se pretendía determinar si las PSV de células 293-VII+ pueden activar los linfocitos T CD8+ específicos para VEB, una población celular que es esencial para la vigilancia de las células infectadas por VEB *in vivo*. Para someter a ensayo la capacidad de las PSV para reactivar linfocitos T CD8+, las PBMC se incubaron primero con PSV de células 293-VII+ o exosomas de células 293 durante la noche y luego se usaron como dianas para clones de linfocitos T CD8+ específicos para VEB. Un ELISA de IFN- γ reveló una activación débil pero evidente de los linfocitos T incubados con PBMC que se habían preincubado con PSV (Fig. 8B). En la siguiente serie de experimentos, se estimularon PBMC de donantes seropositivos para VEB con PBMC autólogas e irradiadas previamente incubadas con PSV de células 293-VII+. Después de 28 días y tres rondas de estimulación, un análisis detallado por citometría de flujo reveló que las PBMC cargadas con PSV de células 293-VII+ inducían la proliferación de linfocitos T CD4+ autólogos, en contraste con las PBMC cargadas con exosomas de células HEK293 parentales o PBMC no tratadas (Fig. 10A). Para determinar si las PSV también reactivaron linfocitos T CD8+ específicos para VEB, se midió su frecuencia inicial en PBMC donantes y se compararon con poblaciones de linfocitos T CD8+ expandidos con PSV *in vitro* para el reconocimiento específico de epítomos de VEB de clase I HLA conocidos, que provocan fuertes respuestas inmunitarias de los linfocitos T CD8+ en hospedadores infectados. El epítomo peptídico CLG de la proteína latente LMP2 y los epítomos peptídicos EPL/RAK, GLC e YVL de las proteínas líticas tempranas BZLF1, BMLF1 y BRLF1, respectivamente, se eligieron por ser restringidos para HLA B03/B08 o A02. La tinción con pentámeros HLA/péptido reveló una fracción pequeña pero detectable de linfocitos T CD8+ en las PBMC donantes iniciales que reconocían predominantemente los epítomos líticos tempranos (Fig. 10B). La fracción de linfocitos T CD8+ específicos del epítomo se expandió de aproximadamente un 0,15 % a un 0,25 % a un 1,1 % a un 2,4 % en tres rondas de estimulación de PSV (Fig. 10B) y los números absolutos de linfocitos T CD8+ específicos del epítomo aumentaron en hasta 10 veces aproximadamente (Fig. 10C). Este hallazgo está en conflicto con una publicación reciente, ya que los linfocitos B no procesaron eficazmente partículas víricas o PSV para la presentación cruzada asociada a HLA clase I, en contraste con las células presentadoras de antígenos profesionales tales como las células dendríticas o los macrófagos (Keller et al., 2009). Por lo tanto, se esperaba que los monocitos o macrófagos en PBMC pudieran presentar péptidos derivados de PSV a linfocitos T CD8+ para su activación. Para abordar esta controversia, se purificaron células CD19+ y CD19- a partir de PBMC y se incubaron las células mononucleares fraccionadas con PSV de células 293-VII+ o de exosomas de células HEK293. La reactivación de los linfocitos T inmediatamente después de la tercera ronda de estimulación con PBMC cargadas con PSV se cuantificó en ensayos Elispot de IFN- γ con PBMC CD19+ y CD19-. Los resultados indicaron claramente que solo los linfocitos B CD19+ son presentadores potentes de antígenos víricos derivados de PSV (Fig. 9). No se identificó casi ningún linfocito T con PBMC CD19- como células presentadoras de antígeno (Fig. 9), lo que sugiere que solo los linfocitos B activaron los linfocitos T específicos del epítomo del virus, incluidos los linfocitos T CD8+ restringidos a HLA clase I.

Ejemplo 8: Las PSV provocan anticuerpos neutralizantes de alto título específicos para VEB y respuestas inmunitarias celulares en ratones Balb/c no sometidos a experimentación previa

Esta es una repetición del ejemplo 3 (ver también la Fig. 4) que incluye más datos (ver la Fig. 11). En aras de la exhaustividad, se describe nuevamente la metodología, dado que incluye variaciones. Los inventores inmunizaron ratones BALB/c (cuatro animales) dos veces en un período de 14 días con 10 μ g de PSV, mientras que los ratones de control (dos animales) fueron inmunizados con la misma cantidad de exosomas de células HEK293. Cuatro semanas después de la segunda inmunización, los sueros se analizaron con un ELISA para determinar la presencia de anticuerpos específicos contra VEB y de lisados de proteínas de células HEK293 como antígenos, que se habían transfectado transitoriamente con plásmidos de expresión para proteínas de VEB individuales como se muestra en la Figura 11A. Para evitar señales de fondo causadas por anticuerpos producidos contra proteínas derivadas de HEK293, los sueros se preincubaron durante 2 horas con placas de cultivo celular recubiertas con lisados de HEK293. Como se muestra, los sueros de ratones inmunizados con PSV, pero no los ratones inmunizados con exosomas de células HEK293, revelaron una fuerte inmunorreactividad contra las proteínas víricas seleccionadas, que son componentes de viriones de VEB. Todos los anticuerpos fueron detectables inequívocamente en sueros de ratones inmunizados con PSV a diluciones de 1 a 200 (Fig. 11A). Los ratones inmunizados con PSV también desarrollaron altos niveles de anticuerpos contra el factor de transcripción Zta, codificado por el gen BZLF1. Como controles, se midió la reactividad de los sueros frente a lisados de células HEK293 transfectadas con plásmidos de expresión que codifican la proteína del tegumento CMV pp65 y el transactivador de VEB EBNA2. El EBNA2 se traduce del gen BYRF1, que está eliminado en el genoma auxiliar de VEB en células 293-VII+ (Fig. 1). Como se anticipó, no se detectaron respuestas humorales contra estas dos proteínas en los ratones inmunizados con PSV, lo que indica la especificidad de estos ensayos.

Para saber si los sueros de animales inmunizados con PSV contenían anticuerpos neutralizantes específicos contra VEB, que pueden inhibir la infección celular por VEB, se utilizó la gfp recombinante que codifica VEB 2089, que confiere fluorescencia de GFP a los linfocitos B como una medida cuantitativa de infección (Delecluse et al. 1998). Las reservas de virus de VEB 2089 se preincubaron con sueros de ratón durante 30 minutos y luego se usaron para infectar linfocitos B humanos primarios a una multiplicidad de infección calculada de 0,1. Después de 48 horas, las células infectadas con GFP se cuantificaron mediante citometría de flujo. Como se muestra en la Fig. 11B, los sueros de ratones inmunizados con PSV alteraron la infección por VEB, aunque los sueros de ratones inmunizados con exosomas de células HEK293 también tuvieron un efecto inhibitorio pero más débil, probablemente debido a la inducción de anticuerpos contra proteínas derivadas de 293. Las reservas de virus de VEB 2089 se obtienen de

células productoras HEK293 (Delecluse et al., 1998), lo que sugiere que los sueros de ratones inmunizados con exosomas de células HEK293 también podrían reconocer partículas de VEB 2089 y comprometer su infectividad.

A continuación, se preguntó si la inmunización de ratones conducía a la inducción de respuestas inmunitarias celulares específicas para VEB, que son esenciales para la vigilancia inmunitaria del VEB. Se prepararon células individuales a partir de bazos de ratones inmunizados con PSV y de ratones de control descritos anteriormente. Los esplenocitos irradiados letalmente de ratones individuales se incubaron con lisados obtenidos a partir de células HEK293 transfectadas transitoriamente con plásmidos de expresión únicos que codifican los genes víricos mostrados en la Figura 11C y presentes en viriones. Para permitir la adsorción, la degradación proteolítica y la presentación de los lisadosañadidos exógenamente, los esplenocitos se incubaron durante cinco horas y posteriormente se lavaron para eliminar el lisado libre. La capacidad de las células para presentar antígeno se evaluó con 5×10^5 esplenocitos no irradiados, que se agregaron como indicadores. La activación de las células indicadoras se determinó en un ensayo Elispot de IFN- γ después de 24 horas. Como se muestra en la Fig. 11C, los esplenocitos de ratones inmunizados con PSV, pero no de ratones de control inmunizados con exosomas de células HEK293, se reactivaron claramente. Tomado en su conjunto, este experimento indicó que las PSV de células 293-VII+ pueden inducir una respuesta inmunitaria celular específica para VEB en ratones que no han sido tratados previamente.

Bibliografía

- Adhikary, D., U. Behrends, R. Feederle, H. J. Delecluse y J. Mautner. 2008. Standardized and highly efficient expansion of Epstein-Barr virus-specific CD4+ T cells by using virus-like particles. *J. Virol.* 82:3903-3911.
- 20 Becker, N., Fortuny, J., Alvaro, T., Nieters, A., Maynadie, M., Foretova, L., Staines, A., Brennan, P., Boffetta, P., Cocco, P. L. y de Sanjose, S. (2009). Medical history and risk of lymphoma: results of a European case-control study (EPILYMPH). *J Cancer Res Clin Oncol* 135, 1099-1107.
- Braasch, D. A. y Corey, D. R. (2001). Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol* 8, 1-7.
- 25 Bornkamm, G. W., C. Berens, C. Kuklik-Roos, J. M. Bechet, G. Laux, J. Bachl, M. Korndoerfer, M. Schlee, M. Holzel, A. Malamoussi, R. D. Chapman, F. Nimmerjahn, J. Mautner, W. Hillen, H. Bujard y J. Feuillard. 2005. Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* 33: e137.
- Busse, C., Feederle, R., Schnolzer, M., Behrends, U., Mautner, J. y Delecluse, H. J. (2010). Epstein-Barr viruses that express a CD21 antibody provide evidence that gp350's functions extend beyond B-cell surface binding. *J Virol* 84, 1139-1147.
- 30 Calistri, A., Salata, C., Parolin, C. y Palu, G. (2009). Role of multivesicular bodies and their components in the egress of enveloped RNA viruses. *Rev Med Virol* 19, 31-45.
- Chesnokova, L. S., Nishimura, S. L. y Hutt-Fletcher, L. M. (2009). Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins alphavbeta6 or alphavbeta8. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 20464-20469.
- 35 Delecluse, H. J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R. y Hammerschmidt, W. (1998). Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 8245-8250.
- Delecluse, H. J., Pich, D., Hilsendegen, T., Baum, C. y Hammerschmidt, W. (1999). A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 5188-5193.
- 40 Duchini, A., Goss, J. A., Karpen, S. y Pockros, P. J. (2003). Vaccinations for adult solid-organ transplant recipients: current recommendations and protocols. *Clin Microbiol Rev* 16, 357-364.
- Elliott, S. L., Suhrbier, A., Miles, J. J., Lawrence, G., Pye, S. J., Le, T. T., Rosenstengel, A., Nguyen, T., Allworth, A., Burrows, S. R., Cox, J., Pye, D., Moss, D. J. y Bharadwaj, M. (2008). Phase I trial of a CD8+ T-cell peptide epitope-based vaccine for infectious mononucleosis. *J Virol* 82, 1448-1457.
- 45 Everly, M. J., Bloom, R. D., Tsai, D. E. y Trofe, J. (2007). Posttransplant lymphoproliferative disorder. *Ann Pharmacother* 41, 1850-1858.
- Forster, K., V. Helbl, T. Lederer, S. Urlinger, N. Wittenburg y W. Hillen. 1999. Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 27:708-710.
- 50 Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D. y Hammerschmidt, W. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J* 16, 6131-6140.
- Goldacre, M. J., Wotton, C. J. y Yeates, D. G. (2009). Associations between infectious mononucleosis and cancer:

record-linkage studies. *Epidemiol Infect* 137, 672-680.

Green, K. J., J. J. Miles, J. Tellam, W. J. van Zuylen, G. Connolly y S. R. Burrows. 2004. Potent T cell response to a class I-binding 13-mer viral epitope and the influence of HLA micropolymorphism in controlling epitope length. *Eur J Immunol* 34:2510-2519.

- 5 Gu, S. Y., Huang, T. M., Ruan, L., Miao, Y. H., Lu, H., Chu, C. M., Motz, M. y Wolf, H. (1995). First EBV vaccine trial in humans using recombinant vaccinia virus expressing the major membrane antigen. *Dev Biol Stand* 84, 171-177.

Hettich, E., Janz, A., Zeidler, R., Pich, D., Hellebrand, E., Weissflog, B., Moosmann, A. y Hammerschmidt, W. (2006). Genetic design of an optimized packaging cell line for gene vectors transducing human B cells. *Gene Ther* 13, 844-856.

- 10 Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D. y Rickinson, A. B. (2007). Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* 25, 587-617.

Imashuku, S. (2007). Systemic type Epstein-Barr virus-related lymphoproliferative diseases in children and young adults: challenges for pediatric hemato-oncologists and infectious disease specialists. *Pediatr Hematol Oncol* 24, 563-568.

- 15 Janz, A., Oezel, M., Kurzeder, C., Mautner, J., Pich, D., Kost, M., Hammerschmidt, W. y Delecluse, H. J. (2000). Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol* 74, 10142-10152.

Johannsen, E., Luftig, M., Chase, M. R., Weicksel, S., Cahir-McFarland, E., Illanes, D., Sarracino, D. y Kieff, E. (2004). Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 16286-16291.

- 20 Keller, S. A., von Allmen, C. E., Hinton, H. J., Bauer, M., Muntwiler, S., Dietmeier, K., Saudan, P. y Bachmann, M. F. (2009). Follicular and marginal zone B cells fail to cross-present MHC class I-restricted epitopes derived from viral particles. *J Immunol* 182, 6261-6266.

Kempkes, B., D. Pich, R. Zeidler, B. Sugden y W. Hammerschmidt. 1995. immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *J. Virol.* 69:231-238.

- 25 Kieff, E. y Rickinson, A. (2007). Epstein-Barr Virus and Its Replication. En *Fields Virology*, Knipe, D. y P. Howley, eds. (Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins), págs. 2604-2654.

Lopes, V., Young, L. S. y Murray, P. G. (2003). Epstein-Barr virus-associated cancers: aetiology and treatment. *Herpes* 10, 78-82.

- 30 Lu, G., Xie, Z. D., Zhao, S. Y., Ye, L. J., Wu, R. H., Liu, C. Y., Yang, S., Jin, Y. K. y Shen, K. L. (2009). Clinical analysis and follow-up study of chronic active Epstein-Barr virus infection in 53 pediatric cases. *Chin Med J (Engl)* 122, 262-266.

Mautner, J., D. Pich, F. Nimmerjahn, S. Milosevic, D. Adhikary, H. Christoph, K. Witter, G. W. Bornkamm, W. Hammerschmidt y U. Behrens. 2004. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 evades direct immune recognition by CD4+ T helper cells. *Eur J Immunol* 34:2500-2509.

- 35 Mendoza, F., Kunitake, H., Laks, H. y Odum, J. (2006). Post-transplant lymphoproliferative disorder following pediatric heart transplantation. *Pediatr Transplant* 10, 60-66.

Moosmann, A., N. Khan, M. Cobbold, C. Zentz, H. J. Delecluse, G. Hollweck, A. D. Hislop, N. W. Blake, D. Croom-Carter, B. Wollenberg, P. A. Moss, R. Zeidler, A. B. Rickinson y W. Hammerschmidt. 2002. B cells immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells. *Blood* 100:1755-1764.

- 40 Mori, Y., Koike, M., Moriishi, E., Kawabata, A., Tang, H., Oyaizu, H., Uchiyama, Y. y Yamanishi, K. (2008). Human herpesvirus-6 induces MVB formation, and virus egress occurs by an exosomal release pathway. *Traffic* 9, 1728-1742.

- 45 Moutschen, M., Leonard, P., Sokal, E. M., Smets, F., Haumont, M., Mazzu, P., Bollen, A., Denamur, F., Peeters, P., Dubin, G. y Denis, M. (2007). Phase I/II studies to evaluate safety and immunogenicity of a recombinant gp350 Epstein-Barr virus vaccine in healthy adults. *Vaccine* 25, 4697-4705.

Niedobitek, G. (1999). The Epstein-Barr virus: a group 1 carcinogen? *Virchows Arch* 435, 79-86.

Omerovic, J., Lev, L. y Longnecker, R. (2005). The amino terminus of Epstein-Barr virus glycoprotein gH is important for fusion with epithelial and B cells. *J Virol* 79, 12408-12415.

- 50 Pelchen-Matthews, A., Raposo, G. y Marsh, M. (2004). Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol*

12, 310-316.

- 5 Pickering, L. K., Baker, C. J., Freed, G. L., Gall, S. A., Grogg, S. E., Poland, G. A., Rodewald, L. E., Schaffner, W., Stinchfield, P., Tan, L., Zimmerman, R. K. y Orenstein, W. A. (2009). Immunization programs for infants, children, adolescents, and adults: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **49**, 817-840.
- Rees, L., Tizard, E. J., Morgan, A. J., Cubitt, W. D., Finerty, S., Oyewole-Eletu, T. A., Owen, K., Royed, C., Stevens, S. J., Shroff, R. C., Tanday, M. K., Wilson, A. D., Middeldorp, J. M., Amlot, P. L. y Steven, N. M. (2009). A phase I trial of epstein-barr virus gp350 vaccine for children with chronic kidney disease awaiting transplantation. *Transplantation* **88**, 1025-1029.
- 10 Saulquin, X., C. Ibisch, M. A. Peyrat, E. Scotet, M. Hourmant, H. Vie, M. Bonneville y E. Houssaint. 2000. A global appraisal of immunodominant CD8 T cell responses to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus by bulk screening. *Eur J Immunol* **30**:2531-2539.
- 15 Silva, A. L., Omerovic, J., Jardetzky, T. S. y Longnecker, R. (2004). Mutational analyses of Epstein-Barr virus glycoprotein 42 reveal functional domains not involved in receptor binding but required for membrane fusion. *J Virol* **78**, 5946-5956.
- Sokal, E. M., Hoppenbrouwers, K., Vandermeulen, C., Moutschen, M., Leonard, P., Moreels, A., Haumont, M., Bollen, A., Smets, F. y Denis, M. (2007). Recombinant gp350 vaccine for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults. *J Infect Dis* **196**, 1749-1753.
- 20 Sorem, J. y Longnecker, R. (2009). Cleavage of Epstein-Barr virus glycoprotein B is required for full function in cell-cell fusion with both epithelial and B cells. *J Gen Virol* **90**, 591-595.
- Succi, R. C. y Farhat, C. K. (2006). Vaccination in special situations. *J Pediatr (Rio J)* **82**, S91-100.
- 25 Swerdlow, A. J., Higgins, C. D., Hunt, B. J., Thomas, J. A., Burke, M. M., Crawford, D. H. y Yacoub, M. H. (2000). Risk of lymphoid neoplasia after cardiothoracic transplantation: A cohort study of the relation to Epstein-Barr virus. *Transplantation* **69**, 897-904.
- Taylor, A. L., Marcus, R. y Bradley, J. A. (2005). Post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) after solid organ transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol* **56**, 155-167.
- Thacker, E. L., Mirzaei, F. y Ascherio, A. (2006). Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol* **59**, 499-503.
- 30 Tobin, M., Morag, A., Ravid, Z., Chowers, I., Feldman-Weiss, V., Michaeli, Y., Ben-Chetrit, E., Shalit, M. y Knobler, H. (1982). Prolonged atypical illness associated with serological evidence of persistent Epstein-Barr virus infection. *Lancet* **1**, 61-64.
- 35 Urlinger, S., U. Baron, M. Thellmann, M. T. Hasan, H. Bujard y W. Hillen. 2000. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:7963-7968.
- Zaadstra, B. M., Chorus, A. M., van Buuren, S., Kalsbeek, H. y van Noort, J. M. (2008). Selective association of multiple sclerosis with infectious mononucleosis. *Mult Scler* **14**, 307-313.
- Zalani, S., Holley-Guthrie, E. y Kenney, S. (1996). Epstein-Barr viral latency is disrupted by the immediate-early BRLF1 protein through a cell-specific mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 9194-9199.
- 40

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Helmholtz Zentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH) et al.

<120> Una vacuna contra el virus de Epstein-Barr

<130> S2541 PCT

5 <150> EP 10 00 8835.0

<151> 25/08/2010

<150> Documento US 61/377,027

<151> 25/08/2010

<160> 4

10 <170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 555

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: LMP-1 truncado"

<400> 1

```

cttgctctcc ttctcctcct cttggcgcta ctgttttggc tgtacatcgt tatgagtgac      60
tggactggag gagccctcct tgtcctctat tcctttgctc tcatgcttat aattataatt      120
ttgatcatct ttatcttcag aagagacctt ctctgtccac ttggagccct ttgtatactc      180
ctactgatgt caccctcctg ctcatcgctc tctggaattt gcacggacag gcattgttcc      240
ttggaattgt gctgttcatc ttcgggtgct tacttgtag gtatctggat ctacttattg      300
gagatgctct ggcgacttgg tgccaccatc tggcagcttt tggccttctt cctagccttc      360
ttcctagacc tcatcctgct cattattgct ctctatctac aacaaaactg gtggactcta      420
ttggttgatc tcctttggct cctcctgttt ctggcgattt taatctggat gtattacat      480
ggacaacgac acagtgatga acaccaccac gatgactccc tcccgcaccc tcaacaagct      540
accgatgatt ctggc

```

<210> 2

20 <211> 185

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: LMP-1 truncado"

25 <400> 2

ES 2 655 535 T3

Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Phe Trp Leu Tyr Ile
 1 5 10 15
 Val Met Ser Asp Trp Thr Gly Gly Ala Leu Leu Val Leu Tyr Ser Phe
 20 25 30
 Ala Leu Met Leu Ile Ile Ile Ile Leu Ile Ile Phe Ile Phe Arg Arg
 35 40 45
 Asp Leu Leu Cys Pro Leu Gly Ala Leu Cys Ile Leu Leu Leu Met Ser
 50 55 60
 Pro Ser Cys Ser Ser Leu Ser Gly Ile Cys Thr Asp Arg His Cys Ser
 65 70 75 80
 Leu Glu Leu Cys Cys Ser Ser Ser Gly Ala Tyr Leu Leu Gly Ile Trp
 85 90 95
 Ile Tyr Leu Leu Glu Met Leu Trp Arg Leu Gly Ala Thr Ile Trp Gln
 100 105 110
 Leu Leu Ala Phe Phe Leu Ala Phe Phe Leu Asp Leu Ile Leu Leu Ile
 115 120 125
 Ile Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Asn Trp Trp Thr Leu Leu Val Asp Leu
 130 135 140
 Leu Trp Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ile Leu Ile Trp Met Tyr Tyr His
 145 150 155 160
 Gly Gln Arg His Ser Asp Glu His His His Asp Asp Ser Leu Pro His
 165 170 175
 Pro Gln Gln Ala Thr Asp Asp Ser Gly
 180 185

<210> 3

<211> 1158

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> / nota = "Descripción de la secuencia artificial: secuencia de ADNc del virus de Epstein-Barr LMP-1 (cepa B95.8)"

10 <400> 3

ES 2 655 535 T3

atggaacacg accttgagag gggcccaccg ggcccgcgac ggccccctcg aggaccccc 60
ctctcctctt ccctaggcct tgctctcctt ctctctctct tggcgctact gttttggctg 120
tacatcgta tgagtgactg gactggagga gccctccttg tcctctattc ctttgctctc 180
atgcttataa ttataatfff gatcatcttt atcttcagaa gagaccttct ctgtccactt 240
ggagcccttt gtataactcct actgatgtca ccctcctgct catcgctctc tggaatttgc 300
acggacagggc attgttcctt ggaattgtgc tgttcatctt cgggtgctta cttgtaggt 360
atctggatct acttattgga gatgctctgg cgacttggtg ccaccatctg gcagcttttg 420
gccttcttcc tagccttctt cctagacctc atcctgctca ttattgctct ctatctacaa 480
caaaactggg ggactctatt ggttgatctc ctttggtcc tcctgtttct ggcgatttta 540
atctggatgt attaccatgg acaacgacac agtgatgaac accaccacga tgactccctc 600
ccgcaccctc aacaagctac cgatgattct ggccatgaat ctgactctaa ctccaacgag 660
ggcagacacc acctgctcgt gagtggagcc ggcgacggac cccactctg ctctcaaaac 720
ctaggcgcac ctggaggtgg tcctgacaat ggcccacagg accctgacaa cactgatgac 780
aatggcccac aggaccctga caaactgat gacaatggcc cacatgacc gctgcctcag 840
gaccctgaca aactgatga caatggccca caggaccctg acaactga tgacaatggc 900
ccacatgacc cgctgcctca tagccctagc gactctgctg gaaatgatgg aggcctcca 960
caattgacgg aagaggttga aaacaaagga ggtgaccagg gcccgcttt gatgacagac 1020
ggaggcggcg gtcatagtca tgattccggc catggcggcg gtgatccaca ccttcctacg 1080
ctgcttttgg gttcttctgg ttccgggtgga gatgatgacg acccccacgg ccagttcag 1140
ctaagctact atgactaa 1158

<210> 4

<211> 385

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> /nota = "Descripción de secuencia artificial: Proteína LMP-1 de ADNc; cepa B95.8"

<400> 4

ES 2 655 535 T3

Met Glu His Asp Leu Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Arg Arg Pro Pro
1 5 10 15

Arg Gly Pro Pro Leu Ser Ser Ser Leu Gly Leu Ala Leu Leu Leu Leu
20 25 30

Leu Leu Ala Leu Leu Phe Trp Leu Tyr Ile Val Met Ser Asp Trp Thr
35 40 45

Gly Gly Ala Leu Leu Val Leu Tyr Ser Phe Ala Leu Met Leu Ile Ile
50 55 60

Ile Ile Leu Ile Ile Phe Ile Phe Arg Arg Asp Leu Leu Cys Pro Leu
65 70 75 80

Gly Ala Leu Cys Ile Leu Leu Leu Met Ser Pro Ser Cys Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Ile Cys Thr Asp Arg His Cys Ser Leu Glu Leu Cys Cys Ser
100 105 110

Ser Ser Gly Ala Tyr Leu Leu Gly Ile Trp Ile Tyr Leu Leu Glu Met
115 120 125

Leu Trp Arg Leu Gly Ala Thr Ile Trp Gln Leu Leu Ala Phe Phe Leu
130 135 140

Ala Phe Phe Leu Asp Leu Ile Leu Leu Ile Ile Ala Leu Tyr Leu Gln
145 150 155 160

Gln Asn Trp Trp Thr Leu Leu Val Asp Leu Leu Trp Leu Leu Leu Phe
165 170 175

Leu Ala Ile Leu Ile Trp Met Tyr Tyr His Gly Gln Arg His Ser Asp
180 185 190

Glu His His His Asp Asp Ser Leu Pro His Pro Gln Gln Ala Thr Asp
195 200 205

Asp Ser Gly His Glu Ser Asp Ser Asn Ser Asn Glu Gly Arg His His
210 215 220

ES 2 655 535 T3

Leu Leu Val Ser Gly Ala Gly Asp Gly Pro Pro Leu Cys Ser Gln Asn
 225 230 235 240

Leu Gly Ala Pro Gly Gly Gly Pro Asp Asn Gly Pro Gln Asp Pro Asp
 245 250 255

Asn Thr Asp Asp Asn Gly Pro Gln Asp Pro Asp Asn Thr Asp Asp Asn
 260 265 270

Gly Pro His Asp Pro Leu Pro Gln Asp Pro Asp Asn Thr Asp Asp Asn
 275 280 285

Gly Pro Gln Asp Pro Asp Asn Thr Asp Asp Asn Gly Pro His Asp Pro
 290 295 300

Leu Pro His Ser Pro Ser Asp Ser Ala Gly Asn Asp Gly Gly Pro Pro
 305 310 315 320

Gln Leu Thr Glu Glu Val Glu Asn Lys Gly Gly Asp Gln Gly Pro Pro
 325 330 335

Leu Met Thr Asp Gly Gly Gly Gly His Ser His Asp Ser Gly His Gly
 340 345 350

Gly Gly Asp Pro His Leu Pro Thr Leu Leu Leu Gly Ser Ser Gly Ser
 355 360 365

Gly Gly Asp Asp Asp Asp Pro His Gly Pro Val Gln Leu Ser Tyr Tyr
 370 375 380

Asp
 385

REIVINDICACIONES

1. Una partícula similar a virus que se puede obtener mediante
 - (a) transfección de una célula humana con un genoma de VEB modificado, en el que dicho genoma de VEB modificado, en comparación con un genoma de VEB de tipo natural, al menos
 - (aa) carece de una o más secuencias que se requieren para el empaquetamiento de dicho genoma de VEB de tipo natural, carece de una o más secuencias que codifican los polipéptidos de VEB requeridos para dicho empaquetamiento y/o comprende una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB cuya capacidad de empaquetamiento está inhabilitada;
 - (ab) carece de una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB que se requieren para la transformación de linfocitos B y/o comprende una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB cuya capacidad de transformación de linfocitos B está inhabilitada; y
 - (ac) carece de una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB que se requieren para inducir la replicación de un VEB y/o comprende una o más secuencias que codifican polipéptidos de VEB cuya capacidad para inducir la replicación de VEB está inhabilitada;
 - (b) cultivo de la célula obtenida en la etapa (a) en condiciones que permitan la expresión de dicho genoma de VEB modificado;
 - (c) inducción de la fase replicativa del VEB; y
 - (d) aislamiento de dicha partícula
- para su uso en un procedimiento para provocar una respuesta inmunitaria celular CD8+ específica para VEB terapéutica o profiláctica y una respuesta inmunitaria humoral en un individuo humano, comprendiendo dicho procedimiento la administración de dicha partícula a dicho individuo humano.
2. La partícula para el uso de la reivindicación 1, en la que en (ab) de la reivindicación 1 un polipéptido cuya capacidad de transformación está inhabilitada es el polipéptido LMP-1.
3. La partícula para el uso de la reivindicación 1 o 2, en la que uno o más polipéptidos de VEB requeridos para la transformación de linfocitos B que están ausentes de acuerdo con (ab) de la reivindicación 1 se seleccionan entre el grupo que consiste en EBNA-2, EBNA-3a, EBNA-3b y EBNA-3C.
4. La partícula para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el uno o más polipéptidos de VEB que se requieren para inducir la replicación de un VEB que faltan o dicho uno o más polipéptidos de VEB cuya capacidad para inducir la replicación del VEB está inhabilitada de acuerdo con (ac) en la reivindicación 1 se seleccionan entre el grupo que consiste en BZLF1, BRLF1, BMLF1 y cualquier combinación de los mismos y en el que en la etapa (c) de la reivindicación 1 se induce la fase replicativa proporcionando a dicha célula el polipéptido o polipéptidos seleccionados.
5. La partícula para el uso de la reivindicación 4, en la que el polipéptido seleccionado es BZLF1.
6. La partícula para el uso de la reivindicación 4 o 5, en la que dicha provisión de dicho uno o más polipéptidos de VEB o dicho BZLF1 a dicha célula se efectúa mediante la expresión de dicho uno o más polipéptidos de VEB o dicho BZLF1 desde un vector transfectado de manera estable en dicha célula.
7. La partícula para el uso de la reivindicación 6, en la que la expresión de dicho uno o más polipéptidos de VEB o dicho BZLF1 se regula de manera inducible.
8. La partícula para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende, después de la etapa (b) y antes de la etapa (c), una etapa adicional (b') que comprende: proporcionar uno o más polipéptidos víricos o no víricos, una o más secuencias de ácidos nucleicos víricos o no víricos y/o uno o más adyuvantes de vacunas a dicha célula, en la que dicho uno o más polipéptidos víricos o dicha una o más secuencias de ácidos nucleicos víricos no son polipéptidos de VEB o secuencias de ácidos nucleicos de VEB, respectivamente.
9. La partícula para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende adicionalmente uno o más polipéptidos víricos o no víricos, una o más secuencias de ácidos nucleicos víricos o no víricos y/o adyuvantes de vacunas, en el que dicho uno o más polipéptidos víricos o dicha una o más secuencias de ácidos nucleicos víricos no son polipéptidos de VEB o secuencias de ácidos nucleicos de VEB, respectivamente.

Figura 1

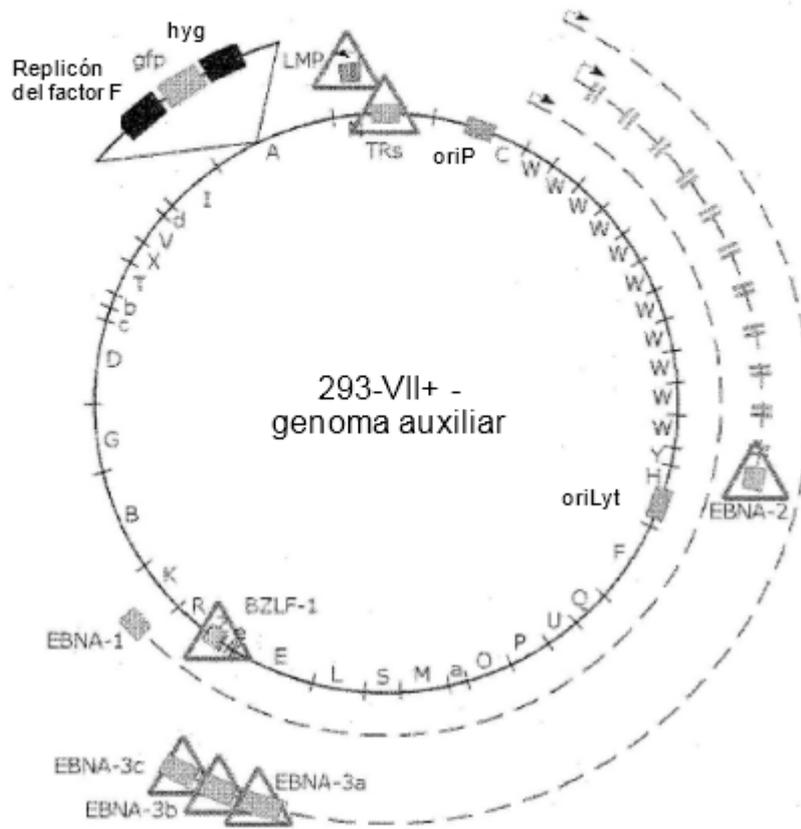


Figura 2

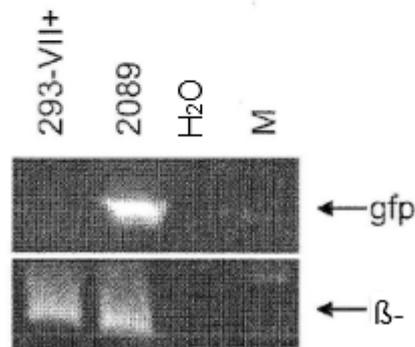


Figura 3a

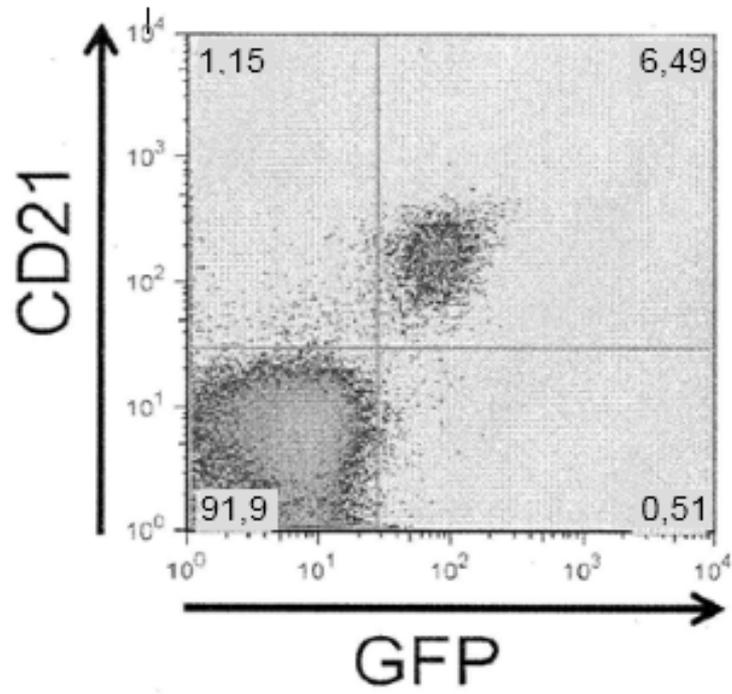


Figura 3b

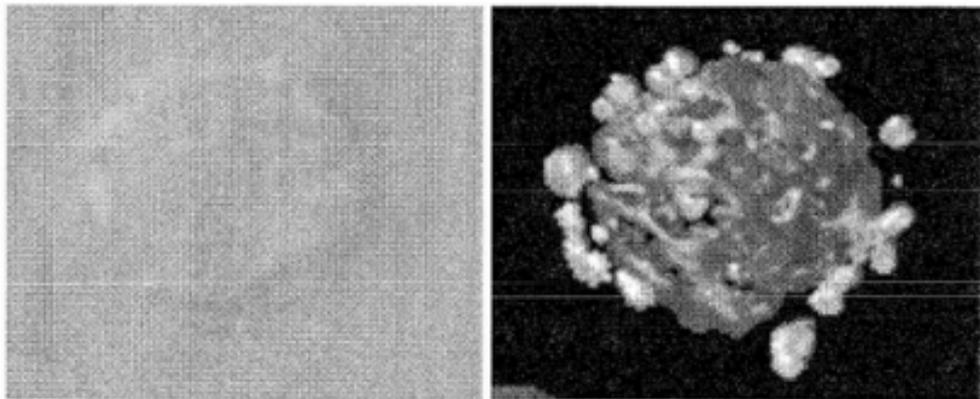


Figura 4

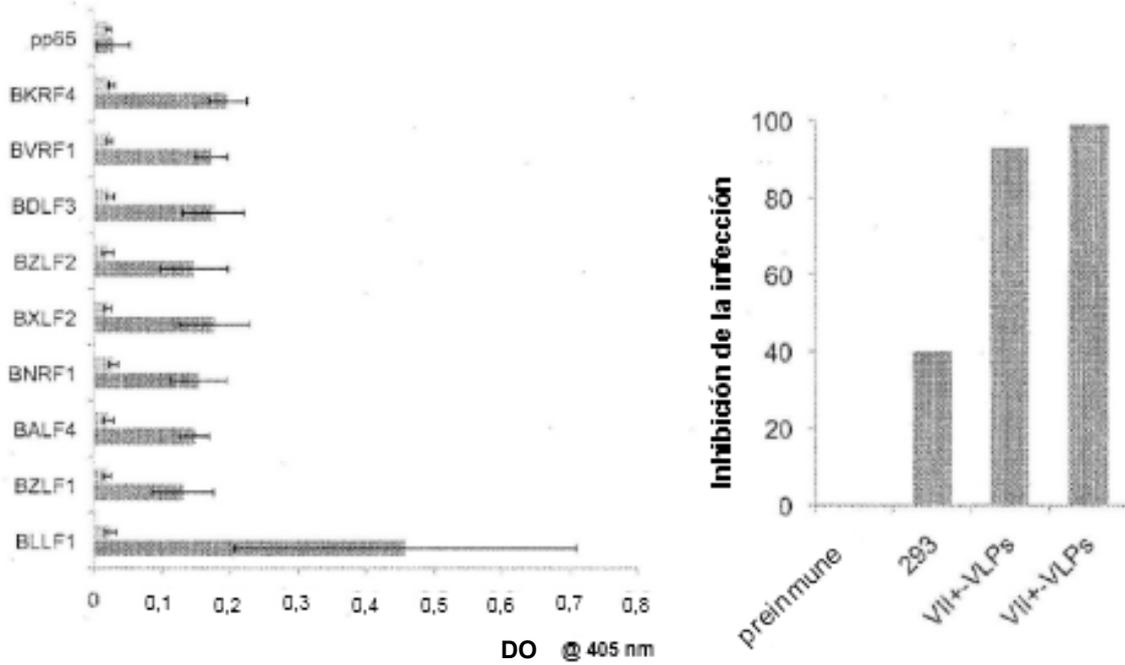


Figura 5

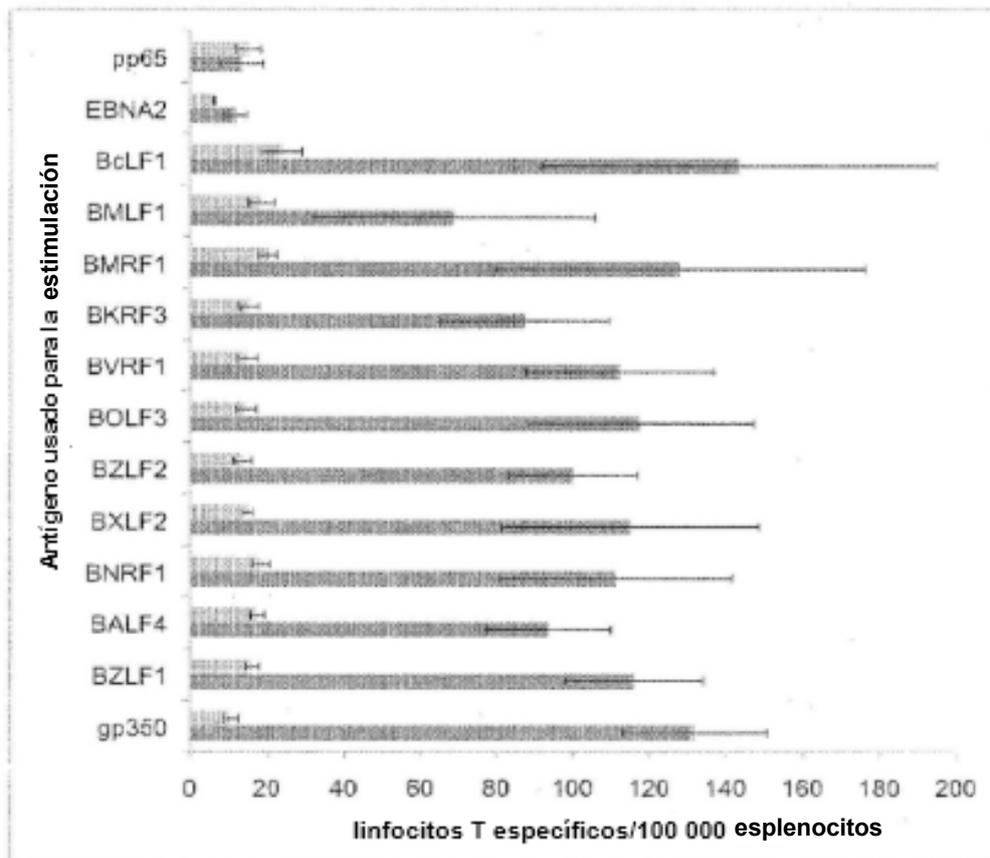


Figura 6

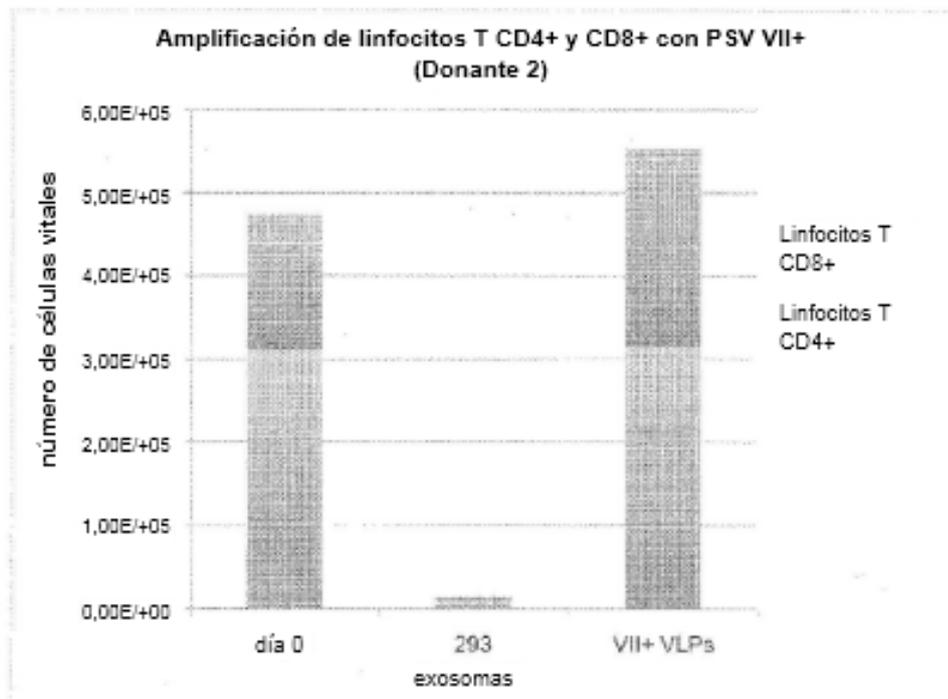
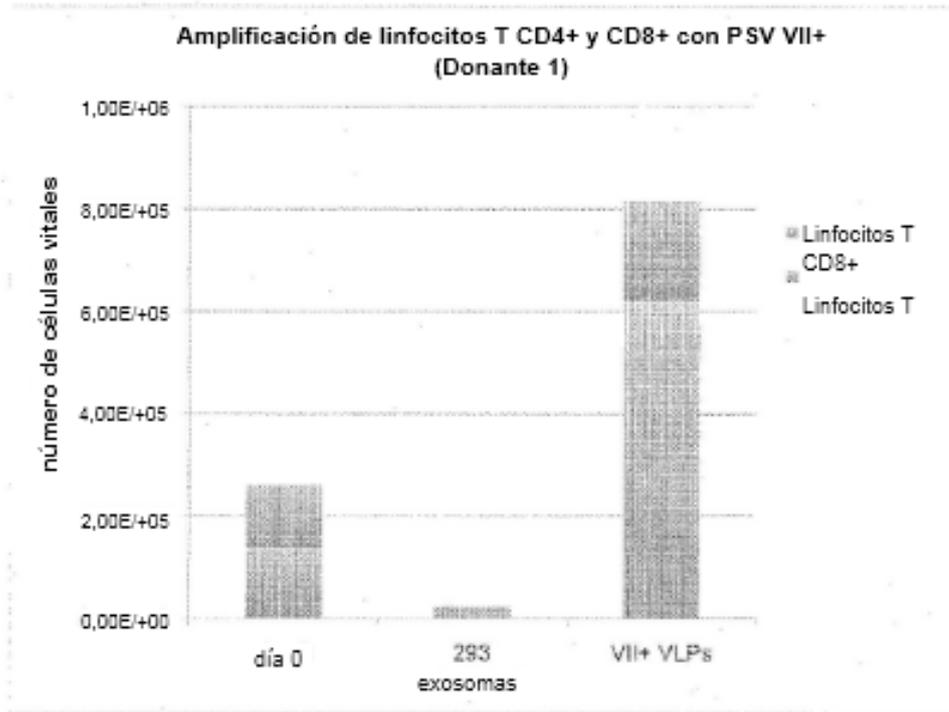


Figura 7

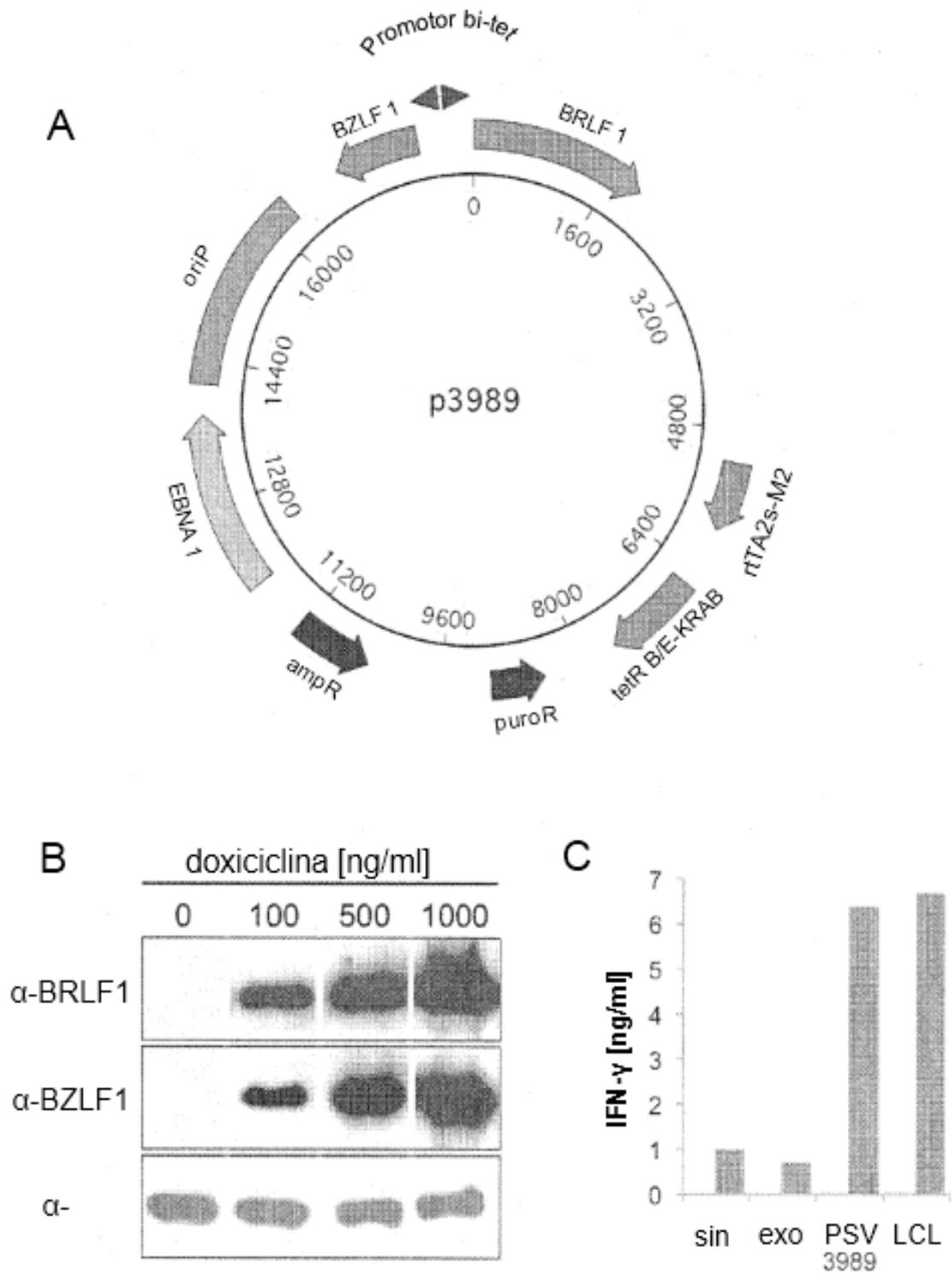


Figura 8

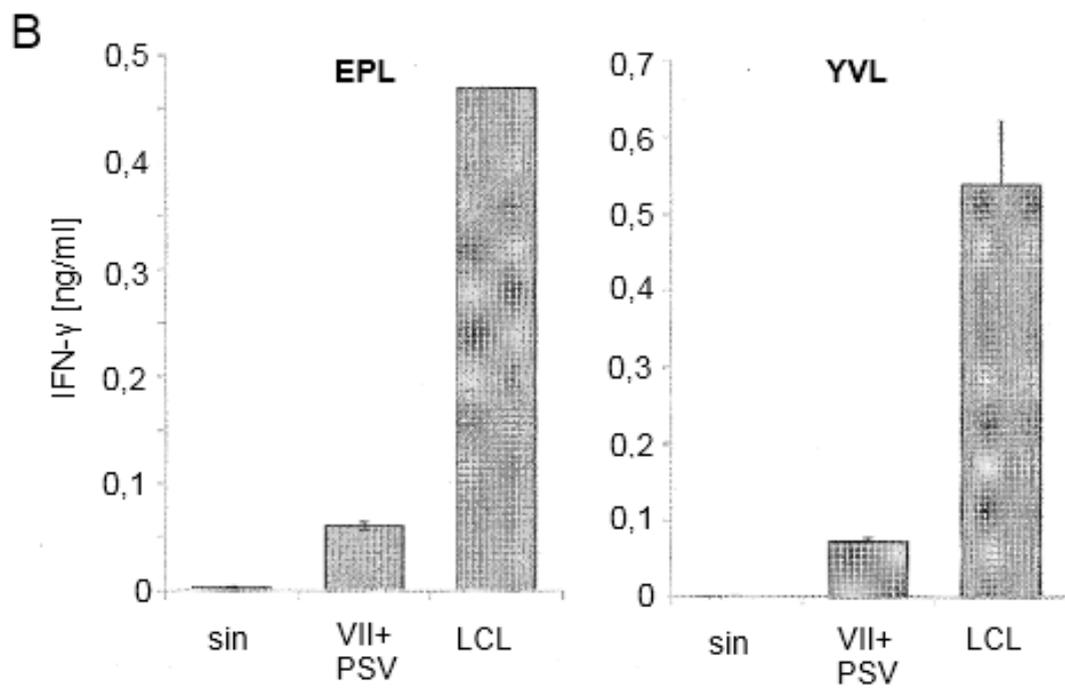
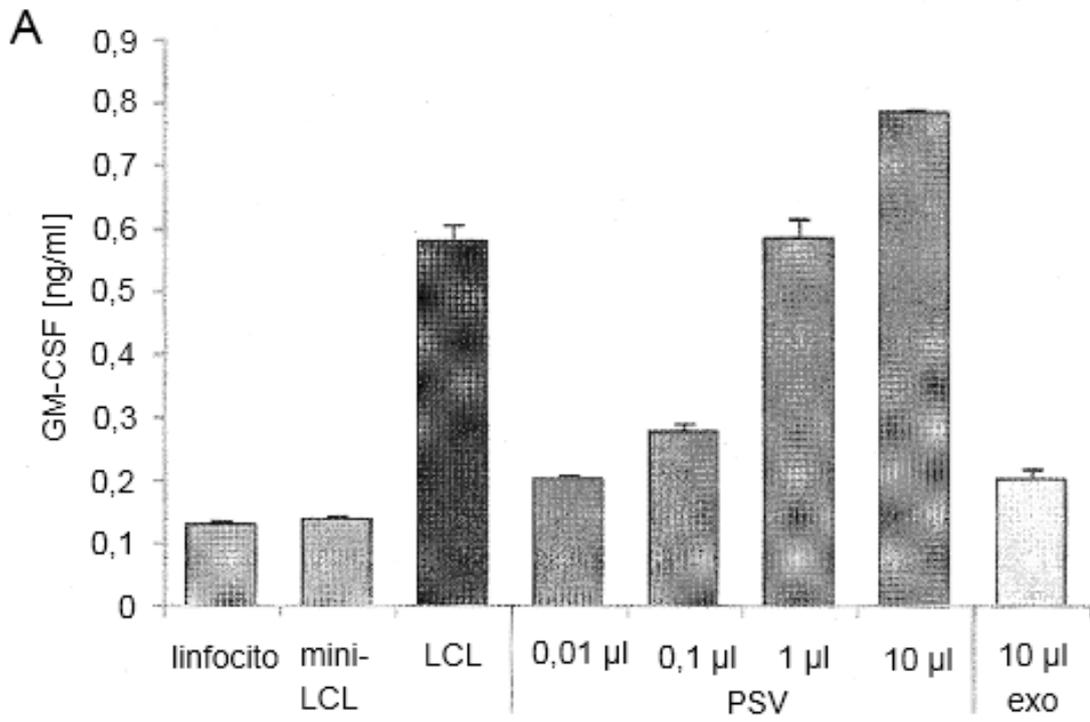


Figura 9:

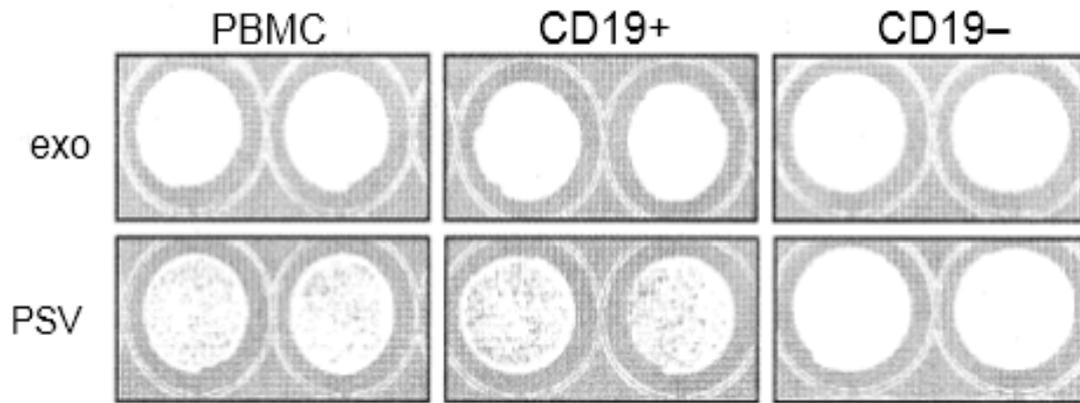


Figura 10:

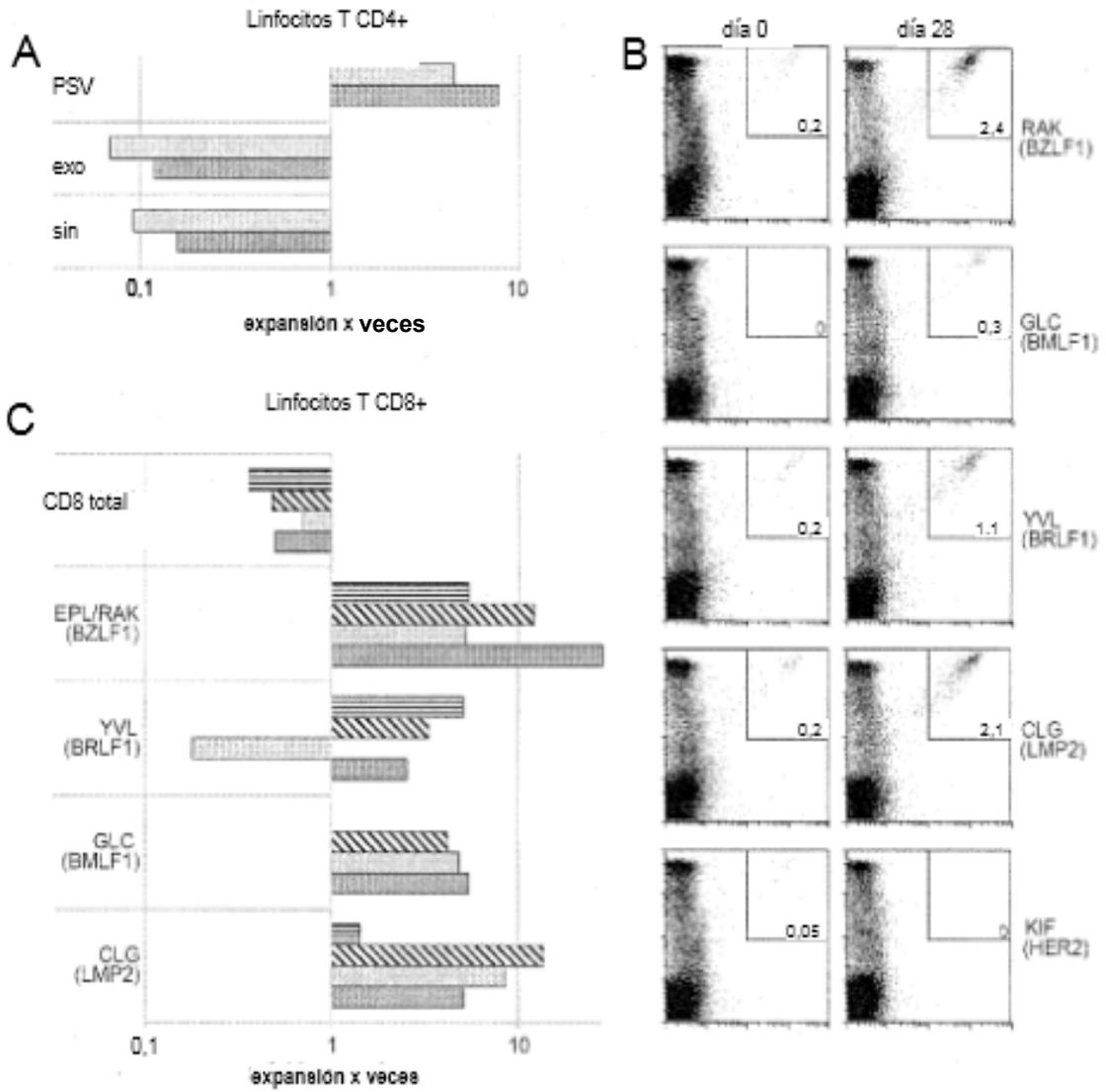


Figura 11:

