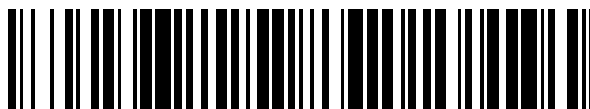


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 039**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2012** **PCT/EP2012/077007**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013** **WO13098364**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2012** **E 12813047 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019** **EP 2797626**

54 Título: **Partículas similares a virus (VLP) de segunda generación a partir de virus de Epstein-Barr para fines de vacunación**

30 Prioridad:

30.12.2011 EP 11196215

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

12.03.2020

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(100.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg , DE**

72 Inventor/es:

**FEEDERLE, REGINA;
HUNDT, SOPHIA y
DELECLUSE, HENRI-JACQUES**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 748 039 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

Partículas similares a virus (VLP) de segunda generación a partir de virus de Epstein-Barr para fines de vacunación

La presente divulgación se refiere a una partícula similar al virus de Epstein-Barr (EB-VLP) sustancialmente libre de ADN del virus de Epstein-Barr (EBV). La presente divulgación también se refiere a un polinucleótido que comprende un genoma de EBV a) que carece de al menos un gen expresable seleccionado del grupo que consiste en el gen BFLF1, el gen BBRF1, el gen BGRF1, el gen BDRF1, el gen BALF3, el gen BFRF1A, y el gen BFRF1, y b) que produce la EB-VLP en una célula huésped adecuada. La presente divulgación se refiere además a un vector y una célula huésped que comprende el polinucleótido de la divulgación, así como a un procedimiento de fabricación de dichas EB-VLP, un procedimiento de fabricación de una vacuna de las mismas, una vacuna y una composición que comprende dichas EB-VLP.

El virus de Epstein-Barr oncógeno (EBV) pertenece a la familia de los gammaherpes virus que pueden infectar a los linfocitos B humanos de forma latente. El EBV establece infecciones persistentes de linfocitos B de por vida en más del 90 % de la población humana (Kieff y B. Rickinson. (2006), Epstein-Barr virus and its replication, en D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), Fields virology, 5ª ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA. 2603-2654; Küppers, R. (2003) B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus, Nat. Rev. Immunol. 3:801-812). En individuos sanos, la mayoría de los linfocitos B infectados con EBV muestran una expresión génica viral limitada y un fenotipo en reposo. La diferenciación terminal de células infectadas de forma latente en células plasmáticas conduce a la reactivación del virus, la producción y la reinfección de linfocitos B (Laichalk, LL y DA Thorley-Lawson. (2005), Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. J. Virol. 79:1296-1307). La expresión de todos los genes de latencia viral provoca la transformación del crecimiento y la proliferación de linfocitos B infectados, lo que se refleja en el crecimiento de líneas de linfocitos B linfoblastoides transformadas por EBV in vitro y por la asociación de EBV con una variedad de enfermedades linfoproliferativas de linfocitos B, incluyendo diferentes tipos de linfoma, in vivo. La infección por EBV está controlada por los linfocitos T, como lo indica una mayor incidencia de neoplasias asociadas con el EBV en pacientes con disfunción congénita o inducida de forma iatrogénica de linfocitos T (Rickinson, AB y E. Kieff. (2006), Epstein-Barr virus, en D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), Fields virology, 5ª ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA., 2655-2700.) y por el tratamiento exitoso de la enfermedad linfoproliferativa asociada al EBV en receptores de trasplantes de células madre hematopoyéticas por la infusión de líneas de linfocitos T policlonales específicos para EBV (Rooney, CM, y col., (1998), Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. Blood 92:1549-1555).

Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de desarrollar una vacuna para prevenir o eliminar la infección por EBV. Dicha vacuna se aplicaría a un sujeto aparentemente sano, por lo que la seguridad de dicha vacuna sería una preocupación importante. Hasta ahora, solo hay una vacuna peptídica contra gp350 de EBV disponible en el mercado. Sin embargo, los primeros ensayos clínicos con esta vacuna muestran que no previene la infección por EBV en receptores de trasplante negativo para EBV (Rees L, y col. (2009), A phase I trial of Epstein-Barr virus gp350 vaccine for children with chronic kidney disease awaiting transplantation. Transplantation 88(8):1025-9.).

Las partículas similares a virus (VLP) son estructuras similares o idénticas a los viriones maduros pero carecen del genoma viral. En general, estimulan la respuesta inmunitaria del huésped en mayor medida que, por ejemplo, los péptidos monoméricos, por lo que se han usado preferentemente para la vacunación contra varios virus tales como la hepatitis B y el virus del papiloma (Greenstone, HL, et. al. (1998), Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1800-1805; Mandic, A., and T. Vujkov. (2004). Human papillomavirus vaccine as a new way of preventing cervical cancer: a dream or the future? Ann. Oncol. 15:197-200). Un aspecto crucial de seguridad de los regímenes de vacunas con VLP es que las VLP usadas deben estar libres de genomas virales (ADN o ARN), ya que de lo contrario la vacunación podría inducir la replicación del virus y/o infección latente por el virus.

La replicación lítica viral, es decir, los procesos que conducen a la formación de partículas virales de la progenie, del EBV y otros herpesvirus es un proceso complejo que resulta de la activación secuencial de diferentes clases de proteínas. Durante la replicación lítica, el genoma viral se amplifica varios miles de veces desde los diferentes orígenes de replicación para formar estructuras altamente ramificadas. Estos concatémoros grandes se resuelven en genomas virales lineales de longitud unitaria que se empaquetarán en procápsidas preformadas dentro del núcleo celular infectado. Las cápsidas que contienen ADN viral sufrirán más cambios estructurales y conformacionales y la salida de la célula infectada como partículas de virión envueltas (Roizman, B. y DM Knipe. (2001), Herpes simplex viruses and their replication, en D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), Fields virology, 4ª ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., 2399-2459.). Un elemento cis esencial que conduce a la encapsidación de EBV son las repeticiones terminales (TR) ubicadas en ambos extremos del genoma lineal que están involucradas en la escisión de genomas virales individuales de los concatémoros formados durante la replicación lítica viral, así como en su empaquetamiento. Se ha generado una cepa mutante de EBV en la que se habían eliminado estas repeticiones terminales (delTR-EBV). Se ha demostrado que después de la inducción del ciclo lítico se produce una gran cantidad de EB-VLP vacías y que la eficacia de la encapsidación del genoma es marcadamente baja, ya que tan solo el 0,001 % de las células infectadas con sobrenadantes que contienen delTR-EBV expresan un marcador gen de dicho genoma, en comparación con el 29 %

cuando se usa un EBV de control (Feederle R, y col., (2005), Defective infectious particles and rare packaged genomes produced by cells carrying terminal-repeat-negative Epstein-Barr virus. J. Virol. 79; 7641-7) Esto indica que las repeticiones terminales son importantes pero no absolutamente esenciales para la encapsidación del genoma. Además, se ha demostrado que las VLP producidas a partir de delTR-EBV aún infectan, aunque rara vez, las células, por lo que no garantizan la seguridad de las VLP delTR-EBV para su uso como vacuna.

En resumen, a pesar de la necesidad existente, hasta ahora no se ha desarrollado ningún procedimiento para producir una vacuna segura y eficiente contra el EBV. Por lo tanto, el problema técnico subyacente a la invención puede verse como la provisión de medios y procedimientos que permitan la producción eficiente de una vacuna contra el EBV. El problema técnico se resuelve mediante las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y a continuación en el presente documento.

Por lo tanto, la presente divulgación se refiere a una partícula similar al virus de Epstein-Barr (EB-VLP) sustancialmente libre de ADN del virus de Epstein-Barr (EBV). La presente invención se refiere a un polinucleótido que comprende un genoma de EBV de acuerdo con la reivindicación 1.

La expresión "partícula similar al virus de Epstein-Barr" o "EB-VLP", como se usa en el presente documento, se refiere a una partícula viral derivada de un EBV que no se replica líticamente ni establece una infección latente en una célula huésped adecuada. Las EB-VLP, preferentemente, tienen una estructura herpesviral esencialmente típica como se analiza por microscopía electrónica, es decir, tienen una cápsida, un tegumento y una membrana externa. Sin embargo, en contraste con la partícula herpesviral normal, las EB-VLP de la presente divulgación están vacías, es decir, no contienen ADN de EBV, preferentemente ningún ADN. Las EB-VLP comprenden las proteínas virales de EB (por ejemplo, cápsida, tegumento, recubrimiento, cubierta, proteínas de superficie o envoltura y glucoproteínas) conocidas por los expertos en la materia para los tipos conocidos de EBV (por ejemplo, EBV tipo 1: Genbank No de ref.: NC_007605. 1 GI: 82503188; genoma: SEQ ID NO: 1; de Jesus O y col. (2003) J. Gen. Virol. 84, 1443-1450 y EBV tipo 2: Genbank No de ref.: NC_009334.1 GI: 139424470; Dolan A y col. (2006) Virology Vol. 350, 164-170), genoma: SEQ ID NO: 2, incluida la cepa M81 (SEQ ID NO: 38)).

Además de las proteínas codificadas por EBV, la EB-VLP también puede comprender uno o más polipéptidos artificiales. La expresión "polipéptido artificial" se refiere a cualquier polipéptido incorporado en una EB-VLP que no está comprendido en un EBV de tipo silvestre. Si se incorpora un polipéptido artificial y, por lo tanto, se incluye en una EB-VLP, se puede evaluar obteniendo EB-VLP de acuerdo con los procedimientos de la presente descripción, separando las EB-VLP de las células productoras, por ejemplo, por centrifugación o por inmunoprecipitación como se describe en los ejemplos a continuación, seguido de la determinación de la presencia del polipéptido artificial en dichas EB-VLP, que se puede lograr, por ejemplo por el procedimiento de inmunotransferencia descrito en los ejemplos o por cualquier otro procedimiento adecuado para el polipéptido específico y conocido por el experto en la materia.

Preferentemente, el polipéptido artificial es un polipéptido de fusión que comprende una parte integral de la membrana de una glucoproteína herpesviral. Más preferentemente, el polipéptido artificial es un polipéptido de fusión que comprende el dominio transmembrana de la proteína gC del virus del herpes simple. En una realización preferida, el polipéptido artificial comprende además una marca detectable. La expresión "marca detectable" se refiere a un tramo de aminoácidos que se añaden a o se introducen en el polipéptido de fusión de la invención. Preferentemente, la marca se añadirá de forma C- o N-terminal al polipéptido de fusión de la presente invención. Dicho tramo de aminoácidos permitirá la detección del polipéptido de fusión por un anticuerpo que reconoce específicamente la marca o permitirá formar una conformación funcional, tal como un quelante, o permitirá la visualización mediante marcas fluorescentes. Las marcas preferidas son la marca Myc, la marca FLAG, la marca 6-His, la marca HA, la marca GST o la marca GFP. Estas marcas son bien conocidas en la técnica. En una realización preferida adicional, dicha proteína de fusión comprende un péptido o polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína inmunógena, preferentemente una proteína inmunógena de un microorganismo patógeno, más preferentemente una proteína de EBV, de la forma más preferente una proteína de EBV latente.

Sin embargo, la presente invención también prevé que uno o más polipéptidos virales de EB no esenciales son o carecen de la EB-VLP. En el contexto de la presente memoria descriptiva, "polipéptido de EBV no esencial" se refiere a un polipéptido incorporado en partículas virales de EB de tipo silvestre pero no esencial para la formación de VLP. Un polipéptido es no esencial si las VLP son detectables por microscopía electrónica o uno de los otros procedimientos descritos en los ejemplos de la presente memoria descriptiva después de que las células huésped adecuadas han sido inducidas a producir VLP de acuerdo con los procedimientos de la presente memoria descriptiva en ausencia de dicho polipéptido. Por ejemplo, el producto del gen BNRF1 de EBV, que se demostró que desempeña un papel en el escape de partículas de EBV de los endosomas después de la infección (Feederle, R, y col. (2006), Epstein-Barr virus BNRF1 protein allows efficient transfer from the endosomal compartment to the nucleus of primary B lymphocytes. J Virol. 80(19):9435-43) puede carecer de una EB-VLP. Los expertos en la materia conocen bien los procedimientos para omitir un polipéptido a partir de una célula huésped durante la infección lítica del EBV. Preferentemente, se omite un polipéptido delecionando el gen que codifica dicho polipéptido del genoma viral o haciendo que dicho gen sea inexpressable por medio de manipulación genética, por ejemplo, mutando el codón de inicio a un codón de no inicio.

La expresión "sustancialmente libre de ADN de EBV" como se usa en el presente documento será entendida por los expertos en la materia. Dicha expresión no necesariamente significa que todas las EB-VLP están libres de ADN de EBV. Sin embargo, la expresión requiere que el número de EB-VLP libres de ADN de EBV producidas por el procedimiento de la invención se incremente en una porción estadísticamente significativa en comparación con los EB-VLP de control. Las VLP de control son VLP delTR-EBV como se ha descrito anteriormente en el presente documento. El experto en la materia puede determinar si una porción es estadísticamente significativa sin más preámbulos usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba de la t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles se encuentran en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los valores p son, preferentemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Además, el número de EB-VLP que contienen ADN de EBV producidas por el procedimiento de la presente invención se reduce preferentemente al menos cinco veces, al menos diez veces, al menos 20 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, o al menos 10000 veces en comparación con las EB-VLP de control.

Preferentemente, las EB-VLP sustancialmente libres de ADN de EBV son EB-VLP que contienen menos de 10000 genomas de EBV/ml de sobrenadante, más preferentemente menos de 1000 genomas de EBV/ml de sobrenadante, incluso más preferentemente menos de 100 genomas de EBV/ml de sobrenadante, y de la manera más preferente menos de 10 genomas de EBV/ml de sobrenadante (cuando se produce y analiza en el ensayo de PCR como se describe en los ejemplos de la presente memoria descriptiva. Preferentemente, el número de genomas de EBV es inferior a $200/10^6$ EBV-VLP, menos de $100/10^6$ EBV -VLP, menos de $50/10^6$ EBV-VLP, menos de $20/10^6$ EBV-VLP, menos de $10/10^6$ EBV-VLP, menos de $1/10^6$ EBV-VLP, menos de $0,1/10^6$ EBV-VLP, o menos de $0,01/10^6$ EBV-VLP.

Preferentemente, las EB-VLP sustancialmente libres de ADN de EBV son EB-VLP que establecen infección latente en células Raji a una velocidad de menos de 10 células infectadas/ml de sobrenadante, más preferentemente menos de 1 célula infectada/ml de sobrenadante, incluso más preferentemente menos de 0,1 células infectadas/ml de sobrenadante, más preferentemente menos de 0,01 células infectadas/ml de sobrenadante cuando se produce y analiza en el ensayo de infección como se describe en los ejemplos de la presente memoria descriptiva. Preferentemente, la velocidad es inferior a 10 células Raji infectadas/ 10^6 EB-VLP, más preferentemente inferior a 1 célula infectada/ 10^6 EB-VLP, incluso más preferentemente inferior a 0,1 células infectadas/ 10^6 EB-VLP, de la manera más preferente inferior a 0,01 infectadas células/ 10^6 EB-VLP.

Preferentemente, las EB-VLP de la presente invención se usan como medicamento. La expresión "uso como medicamento" como se usa en el presente documento se refiere al uso de EB-VLP como agente en el diagnóstico, cura, tratamiento o prevención de una enfermedad.

También preferentemente, las EB-VLP de la presente invención se usan para la vacunación. La "vacunación", como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de material antigénico para estimular el sistema inmunitario de un sujeto para desarrollar inmunidad adaptativa. La vacunación es una vacuna terapéutica o profiláctica.

La vacunación terapéutica se refiere a la vacunación para mejorar o curar una enfermedad o un trastorno al que se hace referencia en el presente documento o sus síntomas acompañantes en un grado significativo. La vacunación terapéutica puede conducir a una restauración completa de la salud con respecto a las enfermedades o trastornos mencionados en el presente documento. Debe entenderse que la vacunación terapéutica como se usa de acuerdo con la presente invención puede no ser efectiva en todos los sujetos. Sin embargo, el término requerirá que una porción estadísticamente significativa de los sujetos que padecen una enfermedad o trastorno a los que se hace referencia en este documento puedan tratarse con éxito. El experto en la materia puede determinar si una porción es estadísticamente significativa sin más preámbulos usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba de la t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los intervalos de confianza preferidos son al menos al 90 %, al menos al 95 %, al menos al 97 %, al menos al 98 % o al menos al 99 %. Los valores p son, preferentemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Preferentemente, el tratamiento será efectivo para al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de los sujetos de una determinada cohorte o población.

La vacunación profiláctica se refiere a la vacunación para conservar la salud con respecto a las enfermedades o trastornos a los que se hace referencia en el presente documento durante un cierto período de tiempo, preferentemente de por vida, en un sujeto. Se entenderá que dicho período de tiempo depende de la cantidad de EB-VLP que se ha administrado y de factores individuales del sujeto analizados en otra parte de esta memoria descriptiva. Debe entenderse que la vacunación profiláctica puede no ser efectiva en todos los sujetos tratados con EB-VLP de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, la expresión requiere que se evite efectivamente que una porción estadísticamente significativa de los sujetos de una cohorte o población sufran una enfermedad o trastorno al que se hace referencia en el presente documento o sus síntomas acompañantes. Preferentemente, se prevé una cohorte o población de sujetos en este contexto que normalmente, es decir, sin vacunación profiláctica de acuerdo con la presente invención, desarrollaría una enfermedad o trastorno como se hace referencia en el presente documento. El experto en la materia puede determinar si una porción es estadísticamente significativa sin más preámbulos usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas que se analizan en otra parte de esta memoria descriptiva.

Las definiciones realizadas anteriormente se aplican *mutatis mutandis* a lo siguiente:

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un polinucleótido que comprende un genoma de EBV de acuerdo con la reivindicación 1. Además, la presente divulgación se refiere a un polinucleótido que comprende un genoma de EBV a) que carece de al menos un gen expresable seleccionado del grupo que consiste en el gen BFLF1, el gen BBRF1, el gen BGRF1, el gen BDRF1, el gen BALF3, el gen BFRF1A y el gen BFRF1, y b) que es capaz de producir la EB-VLP de la presente divulgación en una célula huésped adecuada.

El término "polinucleótido" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico lineal o circular. El polinucleótido de la presente invención se proporcionará, preferentemente, como un polinucleótido aislado (es decir, aislado de su contexto natural) o en forma genéticamente modificada. El término abarca polinucleótidos monocatenarios y bicatenarios. Además, también se incluyen polinucleótidos modificados químicamente que incluyen polinucleótidos modificados de origen natural, tales como polinucleótidos glucosilados o metilados, o derivados modificados artificialmente, tales como polinucleótidos biotinilados.

El polinucleótido de la presente invención comprende un genoma de EBV que carece de al menos un gen expresable seleccionado del grupo que consiste en el gen BFLF1 (gen para EBV tipo 1: SEQ ID NO: 3; producto de proteína SEQ ID NO: 4, Genbank No de ref.: YP_401648.1 GI: 82503206; gen para EBV tipo 2: SEQ ID NO: 5; producto de proteína SEQ ID NO: 6, Genbank No de ref.: YP_001129444.1 GI: 139424479), y el gen BBRF1 (gen para EBV tipo 1: SEQ ID NO: 7; producto de proteína SEQ ID NO: 8, Genbank No de ref.: YP_401682.1 GI: 82503238; gen para EBV tipo 2: SEQ ID NO: 9; producto de proteína SEQ ID NO: 10, Genbank No de ref.: YP_001129476.1 GI: 123811640). La divulgación adicional se refiere a un genoma de EBV que carece de al menos un gen expresable seleccionado del grupo que consiste en el gen BGRF1/BDRF1 (gen para EBV tipo 1: SEQ ID NO: 11, producto de proteína SEQ ID NO: 12, Genbank No de ref.: YP_401690.1 GI: 82503246; gen para EBV tipo 2: SEQ ID NO: 13; producto de proteína SEQ ID NO: 14, Genbank No de ref.: YP_001129485.1 GI: 139424519), el gen BALF3 (gen para EBV tipo 1: SEQ ID NO: 15; producto de proteína SEQ ID NO: 16, Genbank No de ref.: YP_401715.1 GI: 82503271; gen para EBV tipo 2: SEQ ID NO: 17; producto de proteína SEQ ID NO: 18, Genbank No de ref.: YP_001129509.1 GI: 139424543), el gen BFRF1A (gen para EBV tipo 1: SEQ ID NO: 19; producto de proteína SEQ ID NO: 20, Genbank No de ref.: YP_401728.1 GI: 82503279; gen para EBV tipo 2 : SEQ ID NO: 21; producto de proteína SEQ ID NO: 22, Genbank No de ref.: YP_001129445.1 GI: 139424480), y el gen BFRF1 (gen para EBV tipo 1: SEQ ID NO: 23; producto de proteína SEQ ID NO : 24, Genbank No de ref.: YP_401649.1 GI: 82503207; gen para EBV tipo 2: SEQ ID NO: 25; producto de proteína SEQ ID NO: 26, Genbank No de ref.: YP_001129446 GI: 139424481). Los productos de dichos genes son proteínas con una actividad esencial para el empaquetamiento del ADN viral en procápsidas de EBV, por lo que la eliminación de su función conduce a la producción de EB-VLP de la presente divulgación. La expresión "que carece de un gen expresable" se refiere a un genoma de EBV en el que al menos un gen seleccionado del grupo como se definió anteriormente se ha modificado de manera que no se puede expresar un producto de proteína funcional. Esto se puede lograr de varias maneras conocidas por el experto en la materia y detalladas en los ejemplos a continuación.

Preferentemente, al menos uno de los genes anteriores se modifica mediante la introducción de una delección, adición y/o sustitución de al menos un nucleótido que conduce a un truncamiento, alteración o mutación de la proteína producida a partir de dicho gen. Dichas modificaciones abarcan mutaciones puntuales en el gen que dan como resultado la generación de un codón de terminación, así como modificaciones que dan como resultado un cambio del marco de lectura abierto. Dichos polipéptidos que se crean son anormalmente cortos o anormalmente largos y no tienen función biológica. También se abarcan mutaciones puntuales en el gen que dan como resultado un polipéptido sin función biológica o con una función biológica disminuida. También preferentemente, se puede introducir, preferentemente, una delección, adición y/o sustitución de al menos un nucleótido que conduce a una inactivación de la secuencia de control transcripcional (es decir, el promotor) que gobierna la expresión del gen. Además, se pueden introducir, preferentemente, secuencias que en el ARN transcrito dan como resultado una mayor degradación del ARN. Más preferentemente, el locus completo para el al menos uno de los genes anteriores se elimina o reemplaza por un ácido nucleico no funcional o no expresable. De la manera más preferente, el marco de lectura abierto se sustituye por un gen marcador seleccionable, tal como el gen de resistencia a kanamicina como se indica en las figuras y los ejemplos, a continuación.

La prueba de si una modificación dada de uno de los genes anteriores conduce a un gen no expresable dependerá de la naturaleza de la modificación introducida, como sabrá el experto en la materia. Por ejemplo, si se ha delecionado una gran parte de la secuencia codificante de un gen, será apropiada la separación electroforética de las proteínas de EBV seguida de inmunotransferencia con un anticuerpo específico para el producto de proteína de dicho gen, ya que el producto del gen que contiene la delección tendrá una masa molecular aparente más baja. Por otro lado, si uno de los genes anteriores se deleciona por completo, el análisis de restricción del genoma EBV resultante puede ser suficiente. En cada caso, la pérdida de la función de uno de los genes anteriores se puede analizar detectando EB-VLP de la presente divulgación, es decir, EB-VLP sustancialmente libre de ADN de EBV de acuerdo con los procedimientos detallados a continuación.

El polinucleótido de la presente invención es un polinucleótido que comprende un genoma de EBV con la actividad biológica de dirigir la producción de EB-VLP de acuerdo con la presente divulgación en una célula huésped adecuada. Los ensayos adecuados para medir dicha actividad se describen en los ejemplos adjuntos. Preferentemente, el polinucleótido comprende una de las secuencias de ácido nucleico mostradas en SEQ ID NO:

27 (un genoma de EBV tipo 1 que comprende una inactivación de BFLF1, es decir, que carece de un gen BFLF1 expresable) o en SEQ ID NO: 28 (un genoma de EBV tipo 1 que comprende una inactivación de BBRF1, es decir, que carece de un gen BBRF1 expresable).

Además, el término "polinucleótido" tal como se usa de acuerdo con la presente invención abarca además variantes de los polinucleótidos específicos mencionados anteriormente. Dichas variantes pueden representar cepas o variantes clonales del polinucleótido de la presente invención. Las variantes de polinucleótidos, preferentemente, comprenden una secuencia de ácido nucleico caracterizada porque la secuencia puede derivarse de las secuencias de ácido nucleico específicas mencionadas anteriormente mediante al menos una sustitución, adición y/o delección de nucleótidos mediante la cual la secuencia de ácido nucleico variante todavía codificará un genoma de EBV que tiene la actividad como se ha especificado anteriormente. Un polinucleótido que comprende un fragmento de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico mencionadas anteriormente también se incluye como un polinucleótido de la presente invención. El fragmento codificará un genoma de EBV que todavía tiene la actividad especificada anteriormente.

Los polinucleótidos de la presente invención consisten esencialmente en las secuencias de ácido nucleico mencionadas anteriormente o comprenden las secuencias de ácido nucleico mencionadas anteriormente. Por lo tanto, pueden contener secuencias de ácido nucleico adicionales también. Específicamente, los polinucleótidos de la presente invención pueden codificar proteínas de fusión en las que un socio de la proteína de fusión es un polipéptido que es codificado por una secuencia de ácido nucleico mencionada anteriormente. Dichas proteínas de fusión pueden comprender como polipéptidos de parte adicional para monitorizar la expresión (por ejemplo, proteínas fluorescentes verdes, amarillas, azules o rojas, fosfatasa alcalina y similares) o las denominadas "marcas" que pueden servir como un marcador detectable o como una medida auxiliar para fines de purificación. Las marcas para los diferentes fines son bien conocidas en la técnica y comprenden marcas FLAG, marcas de 6-histidina, marcas MYC y similares.

Preferentemente, el polinucleótido de la presente invención comprende alteraciones además de las modificaciones detalladas anteriormente. Especialmente, dado que se sabe o se sospecha que algunos de los productos genéticos latentes del EBV tienen un efecto transformador en las células (EBNA2, LMP1, EBNA3A, -B y -C (Hammerschmidt W, Sudgen B (1989) Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B-lymphocytes. Nature 340: 393-397; Cohen JI, y col. (1989) Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. PNAS 86: 9558-9562; Kaye KM, y col. (1993) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. PNAS, 90, 9150-9154; Tomkinson B, y col. (1993) Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA3A and EBNA3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. J. Virol. 62:6762-6771)), es deseable eliminar los genes que codifican estas proteínas transformantes del polinucleótido de la presente invención. Además, se sabe que el producto del gen BZLF1 es la principal proteína de activación que media la entrada del EBV en su ciclo lítico, es decir, la parte productora de virus de su ciclo de vida. Por lo tanto, es preferible eliminar esta funcionalidad del polinucleótido de la presente invención para evitar la producción de virus a partir de genomas residuales aplicados a un sujeto, por ejemplo, durante la vacunación. Los procedimientos de eliminar funcionalmente dichos genes son los mismos que los detallados anteriormente. Más preferentemente, al menos uno, de la manera más preferente todos dichos genes se eliminan por completo.

La expresión "célula huésped adecuada", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula capaz de facilitar la replicación lítica de EBV, que conduce a la producción de EB-VLP. Preferentemente, dicha célula es una célula de mamífero, más preferentemente una célula de primate, incluso más preferentemente una célula humana. De la manera más preferente, la célula huésped es una célula 293. La presente invención también prevé que la célula huésped pueda proporcionar ciertos factores esenciales para la replicación lítica del EBV. Por ejemplo, donde se usa un genoma de EBV que carece de un gen BZLF1 funcional, lo que hace que el virus no pueda entrar en el ciclo lítico, la célula huésped puede proporcionar dicha función después de que una construcción de expresión para dicho gen BZLF1 se haya transfectado en la célula.

Los procedimientos para generar dichas modificaciones son bien conocidos por el experto en la materia e incluyen procedimientos de selección de genes basados en recombinación homóloga, mutagénesis basada en PCR, mutagénesis química usando agentes tales como ENU o EMS, mutagénesis por irradiación y otros. En particular, el locus genético completo puede delecionarse mediante recombinación homóloga como se describe en los ejemplos adjuntos a continuación.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere a un vector de acuerdo con la reivindicación 3, es decir, que comprende el polinucleótido de la presente invención. Preferentemente, el vector es un plásmido o vector viral capaz de mantener de forma estable un genoma de EBV en una célula. Más preferentemente, el vector se deriva del plásmido F de *Escherichia coli* (*E. coli*); El experto en la materia conoce estos vectores como replicón basado en el factor F o cromosoma artificial bacteriano (BAC), que permiten mantener de forma estable un genoma completo de EBV en células bacterianas de *E. coli*. Además, el término también se refiere a construcciones de direccionamiento que permiten la integración aleatoria o dirigida al sitio de la construcción de direccionamiento en el ADN genómico. Dichas construcciones diana, preferentemente, comprenden ADN de longitud suficiente para recombinación homóloga o inserción heteróloga.

El vector que abarca los polinucleótidos de la presente invención, preferentemente, comprende además marcadores seleccionables para propagación y/o selección en un huésped. El vector puede incorporarse a una célula huésped mediante diversas técnicas bien conocidas en la técnica. Si se introduce en una célula huésped, el vector puede residir en el citoplasma o puede incorporarse al genoma. En el último caso, debe entenderse que el vector puede comprender además secuencias de ácido nucleico que permiten la recombinación homóloga o la inserción heteróloga. Los vectores se pueden introducir en células procariotas o eucariotas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Los vectores y las técnicas de transformación o transfección son bien conocidos en la técnica y pueden ser aplicados por el experto en la materia sin más preámbulos. Por ejemplo, un vector plasmídico BAC se puede introducir en células de *E. coli* por electroporación, o en células de mamífero en un complejo con lípidos cargados.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere a una célula huésped que comprende el polinucleótido o el vector de la presente invención.

Las células huésped a las que se hace referencia en el presente documento abarcan células eucariotas, así como células procariotas. En particular, las células procariotas a las que se hace referencia de acuerdo con la presente invención pueden ser células bacterianas que pueden usarse para la propagación, por ejemplo, del polinucleótido o vector de la presente invención. Las bacterias preferidas para este fin son bacterias de *E. coli*, más preferentemente la cepa DH10B. Las células eucariotas son, preferentemente, células que son capaces de expresar genes del genoma de EBV comprendidos en el polinucleótido o vector de la invención. Las células preferidas que expresan genes del ciclo latente del ciclo de vida del EBV son, por ejemplo, células Raji. Más preferentemente, dichas células son capaces de ensamblar partículas similares al virus de Epstein-Barr (EBV-VLP), es decir, células huésped adecuadas como se ha descrito anteriormente.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento para fabricar EB-VLP sustancialmente libres de ADN de EBV de acuerdo con la reivindicación 5. También se desvela un procedimiento para fabricar EB-VLP sustancialmente libres de ADN de EBV, que comprende las etapas de a) cultivar una célula huésped adecuada que comprende el polinucleótido o el vector de la presente invención, y b) obtener EB-VLP sustancialmente libres de ADN de EBV a partir de las células.

El procedimiento de la presente invención, preferentemente, es un procedimiento *in vitro*. Además, puede comprender etapas adicionales a las mencionadas explícitamente anteriormente. Por ejemplo, etapas adicionales pueden referirse a pretratamientos de células huésped adecuadas o postratamientos de sobrenadantes cosechados que comprenden EB-VLP.

El término "cultivo" es conocido por el experto en la materia. Particularmente, el término se refiere a células que crecen fuera del organismo en un medio de cultivo celular. El término también se refiere al proceso de crecimiento de células en cultivo fuera del organismo. Los medios de cultivo celular adecuados son conocidos por el experto en la materia y están disponibles en el mercado. Pueden comprender nutrientes, sales, factores de crecimiento, antibióticos, suero (por ejemplo, suero fetal de ternero) e indicadores de pH (por ejemplo, rojo fenol). Preferentemente, el procedimiento comprende además la etapa de expresar al menos un gen que codifica un polipéptido artificial como se ha descrito en anteriormente el presente documento, en la célula huésped adecuada, que conduce a la incorporación de dicho polipéptido artificial en las EB-VLP.

El término "obtención" se refiere a una etapa de aislamiento y/o purificación conocida por el experto en la materia. Preferentemente, después de dicho aislamiento y/o purificación, las EB-VLP exhiben una pureza de al menos el 80 %, preferentemente el 80 %-90 %, más preferentemente el 90 %-97 %, de la manera más preferida más del 97 % hasta una forma pura absoluta sin contaminación alguna. El término "purificación" abarca medios y procedimientos tales como dispositivos cromatográficos. Los procedimientos usados preferentemente pueden incluir centrifugación en gradiente de densidad, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad y precipitación y columnas. Preferentemente, la obtención de EB-VLP incluye la purificación de EB-VLP uniéndolas a perlas magnéticas a través de anticuerpos anti-gp350 como se describe en los ejemplos a continuación. Preferentemente, las EB-VLP se obtienen a partir del sobrenadante de células huésped adecuadas, es decir, las EB-VLP se liberan en el medio durante el procedimiento de la presente invención.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de una vacuna que comprende las etapas del procedimiento de la presente invención y la etapa adicional de formular las EB-VLP como una vacuna. En otra realización preferida, la presente invención se refiere a una vacuna que contiene EB-VLP sustancialmente libres de ADN de EBV obtenible por el procedimiento de acuerdo con la presente invención.

El término "vacuna" como se usa en el presente documento, preferentemente, se refiere a una composición que comprende EB-VLP sustancialmente libres de ADN de acuerdo con la presente invención que, cuando se administra a un animal, preferentemente un ser humano, provoca una respuesta inmunitaria contra EBV. Por lo tanto, la administración de dicha vacuna estimula el sistema inmunitario y establece o mejora la inmunidad a la infección con EBV. Preferentemente, la vacuna de acuerdo con la presente invención permite establecer o mejorar la inmunidad a la infección con EBV. Preferentemente, la inmunización provoca la activación y expansión de linfocitos T y/o linfocitos B que reconocen específicamente antígenos estructurales de EBV. Más preferentemente, la inmunización

provoca la producción de anticuerpos que evitan la infección de las células del cuerpo por EBV.

La vacuna de la invención, preferentemente, comprende además uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables como se describe en detalle a continuación. La vacuna de la presente invención puede formularse como sal farmacéuticamente aceptable. Las vacunas se administran preferentemente por vía tópica o sistémica. Las vías de administración adecuadas usadas convencionalmente para la administración de fármacos son la administración oral, intravenosa o parenteral, así como la inhalación. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza y el modo de acción de un compuesto, las vacunas también pueden administrarse por otras vías. Además, los compuestos se pueden administrar en combinación con otras vacunas en una vacuna común o como vacunas separadas en las que dichas vacunas separadas se pueden proporcionar en forma de un kit de partes.

Los compuestos se administran preferentemente en formas de dosificación convencionales preparadas combinando las EB-VLP con vehículos farmacéuticos estándar de acuerdo con procedimientos convencionales. Estos procedimientos pueden implicar mezclar, granular y comprimir o disolver los ingredientes según sea apropiado para la preparación deseada. Se apreciará que la forma y el carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable está dictado por la cantidad de principio activo con el que se combinará, la vía de administración y otras variables bien conocidas.

Una dosis terapéuticamente efectiva se refiere a una cantidad de los compuestos a utilizar en una vacuna de la presente invención que induce la inmunización de acuerdo con la presente memoria descriptiva. El régimen de dosificación será determinado por el médico tratante y otros factores clínicos, preferentemente de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. Como es bien sabido en la técnica médica, las dosis para cualquier paciente pueden depender de varios factores, incluyendo la edad del paciente, el compuesto particular que se administrará, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros medicamentos que se administran simultáneamente. La inmunización puede monitorizarse por evaluación periódica. Una dosis típica puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 1 a 1000 µg; sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo ejemplar, especialmente teniendo en cuenta los factores antes mencionados.

Las vacunas y formulaciones a las que se hace referencia en el presente documento se administran al menos una vez para tratar o mejorar o prevenir una enfermedad o afección mencionada en esta memoria descriptiva. Sin embargo, dichas vacunas pueden administrarse más de una vez, por ejemplo, hasta cuatro veces.

Las vacunas específicas se preparan de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica y comprenden al menos EB-VLP mezcladas o asociadas con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Para elaborar esas vacunas específicas, las EB-VLP se mezclarán generalmente con un vehículo o el diluyente, o se encerrarán o encapsularán en una cápsula, bolsita, oblea, papel u otros recipientes o vehículos adecuados. Las formulaciones resultantes deben adoptarse según la vía de administración, es decir, en forma de comprimidos, cápsulas, supositorios, soluciones, suspensiones o similares. Las recomendaciones de dosificación se indicarán en las instrucciones de los prescriptores o usuarios para anticipar los ajustes de dosis dependiendo del receptor considerado.

En una realización preferida adicional, dicha composición comprende además al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o al menos un excipiente. Debe entenderse que los vehículos deben ser aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudiciales para el receptor de los mismos. El vehículo farmacéutico empleado puede ser, por ejemplo, un sólido, un gel o un líquido. Ejemplos de vehículos sólidos son lactosa, alabastro, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábica, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. Ejemplos de vehículos líquidos son solución salina tamponada con fosfato, jarabe, aceite tal como aceite de cacahuete y aceite de oliva, agua, emulsiones, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles y similares.

El o los diluyentes se seleccionan para no afectar a la actividad biológica de la combinación. Ejemplos de dichos diluyentes son agua destilada, solución salina fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, la vacuna o formulación también puede incluir otros vehículos, excipientes o estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunógenos y similares. Dichos estabilizantes no tóxicos, no terapéuticos, no inmunógenos son bien conocidos en la técnica, tales como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera. Dichos vehículos adecuados comprenden los mencionados anteriormente y otros bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

Un componente adicional preferido de la composición es un excipiente. Los excipientes son compuestos que pueden no provocar una respuesta inmunitaria cuando se administran al huésped solos, pero que pueden mejorar aún más la respuesta inmunitaria del huésped cuando se administran junto con los polipéptidos inmunógenos. Se sabe en la técnica que los excipientes pueden actuar como tensioactivos que promueven la concentración de polipéptidos inmunógenos sobre un área de superficie grande, o pueden tener propiedades inmunoestimulantes.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere a una composición que comprende partículas similares al virus de Epstein-Barr (EB-VLP) sustancialmente libres de ADN de EBV obtenible por el procedimiento de la

invención para su uso como vacuna para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad.

La expresión "uso como vacuna para el tratamiento" se refiere al uso de la vacuna de la presente invención como una vacuna terapéutica como se ha especificado anteriormente en el presente documento. Del mismo modo, la expresión "uso como vacuna para la prevención" se refiere al uso como vacuna profiláctica.

- 5 El término "sujeto" se refiere a un organismo metazoico con la capacidad de generar una respuesta inmunitaria a moléculas extrañas al organismo. Preferentemente, el sujeto es un animal, más preferentemente un mamífero, de la manera más preferente un ser humano.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad relacionada con EBV" se refiere a todos los trastornos causados por la infección de un sujeto por EBV. En una realización preferida, dicha enfermedad relacionada con EBV es mononucleosis infecciosa, linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, carcinoma gástrico o trastorno linfoproliferativo posterior al trasplante. Los síntomas que caracterizan estas enfermedades son bien conocidos en la técnica y se describen en los libros de texto estándar de medicina.

Figuras:

15 Figura 1. Construcción de los virus recombinantes EBV Δ BFLF1 y Δ BBRF1.
El panel izquierdo representa el mapa de restricción esquemático de la región del genoma del EBV que contiene los genes BFLF1 o BBRF1 antes y después de la introducción de la mutación. Se indican las ubicaciones de los sitios de restricción de BamHI e HindIII. La mayoría de los marcos de lectura abiertos de BFLF1 o BBRF1 fueron sustituidos por un gen de resistencia a kanamicina. En el caso de la delección de BFLF1, esto condujo al
20 intercambio de un fragmento BamHI de 7,4 kb contra un fragmento BamHI de 7,5 kb o la sustitución de un fragmento HindIII de 29,3 kb mediante una combinación de fragmentos HindIII de 9,1 kb y de 20,2 kb. Se reemplazó un fragmento BamHI de 9,7 kb en el locus del gen BBRF1 por uno de 10,3 kb y se sustituyó un fragmento HindIII de 25,9 kb contra dos fragmentos con tamaños de 23 kb y 3,6 kb respectivamente. El panel derecho muestra el análisis de fragmentos de restricción de virus de tipo silvestre y Δ BFLF1 o Δ BBRF1
25 mutantes. El ADN viral se aisló de *E. coli* y de las líneas celulares de 293 productoras y se digirió con dos enzimas diferentes. Se indican los fragmentos de restricción modificados por la delección de los genes correspondientes.

Figura 2. Inmunotinción de VLP y viriones en sobrenadantes a partir de células productoras inducidas. Los sobrenadantes de las líneas celulares productoras que contienen virus de tipo silvestre o mutantes desprovistos de BFLF1, BBRF1 o de las repeticiones terminales se mezclaron durante una hora a 4 °C con una línea de linfocitos B negativos para EBV. Los virus unidos a los linfocitos B se inmunotñieron con un anticuerpo específico de gp350, seguido de un anticuerpo anti-ratón secundario acoplado a Cy3.

Figura 3. Microfotografías electrónicas de células 293 que contienen genomas de Δ BFLF1, Δ BBRF1, Δ TR o EBV de tipo silvestre.

35 Microfotografías electrónicas de 293 células que contienen genomas de Δ BFLF1, Δ BBRF1, Δ TR o EBV de tipo silvestre después de la inducción de la replicación lítica del virus, microfotografías electrónicas que muestran VLP en sobrenadantes sedimentados de mutantes Δ BFLF1 o Δ BBRF1. El examen reveló una abundancia de cápsidas A y B en preparaciones de los virus Δ BFLF1, Δ BBRF1 y Δ TR. Se observaron cápsidas C maduras llenas de ADN infeccioso en células que contenían el virus de tipo silvestre pero no en las que contenían mutantes. Barras insertadas, 200 nm.

Figura 4. Infección de linfocitos B Raji con Δ BFLF1, Δ BBRF1, Δ TR o virus de tipo silvestre.

Se indica la capacidad de los mutantes y los virus de tipo silvestre para infectar la línea celular Raji B. Los títulos observados se dan como el número de células Raji infectadas con EBV, o unidades Raji verdes, por ml de sobrenadante.

45 Figura 5. Análisis por transferencia de Western usando VLP inmunopurificadas.

Gp350 es una glucoproteína viral presente en la envoltura viral de partículas maduras. Se usó un anticuerpo monoclonal específico para gp350 acoplado a Dynabeads magnéticas para purificar viriones de EBV o VLP a partir de sobrenadantes infecciosos. Los sobrenadantes de las líneas celulares productoras mutantes o de tipo silvestre inducidas se incubaron con las perlas acopladas durante 1 hora a temperatura ambiente. Las partículas de virus unidas se recogieron con un imán, se lavaron 3 veces con RPMI y se usaron para la detección de proteínas virales o ADN viral. Se realizó un análisis por transferencia de Western en VLP/viriones inmunopurificados usando un anticuerpo específico para la proteína del tegumento de EBV BNRF1 (140 kDa). Se detectó BNRF1 en viriones de tipo silvestre, pero también en sobrenadantes de líneas celulares productoras inducidas que contienen mutantes Δ BFLF1, Δ BBRF1 o Δ TR. Los virus mutantes que carecen de gp350 (Δ gp350)
55 se usaron como control negativo en el experimento de purificación.

Figura 6. Análisis por PCR cuantitativa (qPCR) usando VLP inmunopurificadas.

Se evaluó la presencia de ADN viral en VLP o viriones purificados con el anticuerpo específico de gp350 usando qPCR con cebador y sondas específicas para el gen de la polimerasa viral. Los virus de tipo silvestre se usaron

como controles positivos. Los títulos de virus se dan como equivalentes de genoma por ml de sobrenadante.

Figura 7. Los linfocitos B pulsados con Δ BFLF1 y Δ BBRF1 VLP son reconocidos por los linfocitos T específicos de EBV.

Las partículas de virus presentes en 1 ml de los sobrenadantes de virus indicados se purificaron usando anticuerpos para gp350, se acoplaron a perlas magnéticas y se resuspendieron en medio fresco. Las células LCL se pretrataron con las cantidades indicadas de péptido BNRF1 o volúmenes de partículas de virus purificadas. Las LCL pulsadas se incubaron con linfocitos T BNRF1 CD4+ y la producción de GM-CSF se midió por ELISA.

Figura 8. Las VLP pueden incorporar proteínas extrañas.

Un plásmido que codifica el dominio intracitoplasmático y transmembrana de la glucoproteína gC del virus del herpes simple fusionado en marco con 6 histidinas sucesivas (gC-6xhis) se transfeció en la línea celular productora Δ BFLF1 al iniciarse la replicación lítica del EBV. Las partículas de virus producidas se purificaron usando anticuerpos para gp350 acoplados a Dynabeads y se analizaron en transferencia de Western. Solo los virus que se obtuvieron a partir de células 293/ Δ BFLF1 transfectadas con gC-6xhis han incorporado esta proteína.

Figura 9. Inserción de proteínas de fusión gC en la envoltura LP/VLP y evaluación de la eficacia inmunitaria de las partículas. (A) Esquema de las construcciones de proteínas de fusión HSV1-gC-EBV propuestas. (SP, péptido señal gC; His, marca de His; epítipo, epítipo de linfocitos T EBV; TMD, dominio transmembrana gC; y CT, cola citoplasmática gC). (B) transferencia de Western que muestra la expresión de proteínas de fusión gC marcadas con His en LP/VLP. Las LP/VLP se generaron a partir de una línea celular productora mutante de EBV que se indujo en presencia de plásmido que codifica la proteína de fusión gC, o pRK5 como control negativo. Se usó un anticuerpo específico de His. (C) Activación de linfocitos T específicos de epítipo EBNA3C 5H11 después de la incubación de LCL con sobrenadantes de células productoras mutantes inducidas de forma lítica en presencia de plásmido de expresión de proteína de fusión gC-His-5H11 o plásmido vacío pRK5. Se usó ELISA para determinar la secreción de IFN-gamma.

Los siguientes ejemplos ilustrarán meramente la invención. No deben interpretarse, en absoluto, que limitan el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: construcción de los virus recombinantes EBV Δ BFLF1 y Δ BBRF1

Los virus EBV Δ BFLF1 y Δ BBRF1 se obtuvieron intercambiando la mayoría de los marcos de lectura abiertos correspondientes presentes en el plásmido recombinante EBV B95.8-BAC (Proc Natl Acad Sci USA. 7 de julio de 1998; 95 (14): 8245-50. Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. Delecluse HJ, Hilsendegen T, Pich D, Zeidler R, Hammerschmidt W.) (la cepa EBV B95.8 coordina #57131-58568 para BFLF1 y #114204-116042 para BBRF1 (número de referencia V01555)) contra un casete de kanamicina/neomicina flanqueado por sitios frr (coordenadas #57131-58673 en Δ BFLF1 y 114501-116042 en Δ BBRF1) usando recombinación homóloga mediada por RecA en E. coli. Los genomas virales que eliminaron adecuadamente BFLF1 o BBRF1 se seleccionaron con kanamicina. Los clones candidatos se analizaron mediante minipreparación de plásmido junto con análisis de restricción usando las enzimas de restricción HindIII y BamHI para confirmar su estructura (figura 1). La secuenciación confirmó que los marcos de lectura abiertos específicos habían sido deletados y que la recombinación se realizó como se esperaba.

Ejemplo 2: generación de células 293/ Δ BFLF1 y 293/ Δ BBRF1

El ADN de EBV Δ BFLF1 y Δ BBRF1 respectivamente se transfeció a continuación en células 293 y se seleccionó por resistencia a higromicina; el recombinante EBV-BAC porta el gen de resistencia a higromicina y, por lo tanto, permite la selección de células transfectadas de manera estable con los ADN recombinantes. Los genomas de EBV Δ BFLF1 o Δ BBRF1 presentes en los 293 clones resistentes a higromicina se purificaron y se transfirieron nuevamente a las células de E. coli. A partir de estas células bacterianas, se prepararon plásmidos EBV Δ BFLF1 o Δ BBRF1 para confirmar su identidad y su integridad. Se seleccionó uno de cada uno de los clones, denominado 293/ Δ BFLF1 o 293/ Δ BBRF1, respectivamente, para otros experimentos. La transfección transitoria de un plásmido de expresión que codifica el transactivador BZLF1 permite el inicio de la replicación lítica y, por lo tanto, la producción de virus infecciosos o de VLP no infecciosas. Los controles incluyeron 293 células que contienen virus de tipo silvestre. Tres días después de la transfección, los sobrenadantes virales de células 293/ Δ BFLF1 y 293/ Δ BBRF1 se incubaron con células de la línea celular Elijah B negativa para EBV (figura 2). Debido a que los viriones de EBV se unen a los linfocitos B, los virus unidos a la superficie de los linfocitos B pueden revelarse mediante una inmunotinción usando anticuerpos dirigidos contra gp350, un componente de la envoltura viral. Este experimento confirmó que los sobrenadantes de las células 293/ Δ BFLF1 o 293/ Δ BBRF1 inducidas contienen estructuras virales positivas para gp350 que se unen a los linfocitos B y podrían representar VLP o viriones maduros. Se obtuvieron resultados similares con un clon de 293 que contiene virus de tipo silvestre. También se investigaron células 293 que contienen un virus recombinante que carece de repeticiones terminales, una secuencia viral que se usa como señales de empaquetamiento (293/ Δ TR) (Proc Natl Acad Sci USA. 27 de abril de 1999; 96 (9): 5188-93. A first-generation

packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. Delecluse HJ, Pich D, Hilsendegen T, Baum C, Hammerschmidt W.). Anteriormente se demostró que 293/ Δ TR produce VLP (VLP de primera generación) y, por lo tanto, esta línea celular se usó como un control positivo para la detección de estas estructuras virales (J Virol. junio de 2005; 79 (12): 7641-7. Defective infectious particles and rare packaged genomes produced by cells carrying terminal-repeat-negative epstein-barr virus. Feederle R, Shannon-Lowe C, Baldwin G, Delecluse HJ.). Se podría confirmar que los sobrenadantes de 293/ Δ TR inducida contienen estructuras virales que se unen a la superficie de la célula Raji.

Ejemplo 3: análisis microscópico electrónico de células 293 que contienen genomas de Δ BFLF1, Δ BBRF1, Δ TR o EBV de tipo silvestre.

Se proporcionó información adicional sobre la estructura de las partículas virales presentes en los sobrenadantes de 293/ Δ BFLF1 y 293/ Δ BBRF1 inducidas mediante la observación directa de las células productoras mutantes inducidas por BZLF1 y de los sobrenadantes sedimentados de las mismas mediante microscopía electrónica (figura 3). Las microfotografías electrónicas de células 293/ Δ BFLF1 inducidas o de células 293/ Δ BBRF1 muestran que contienen viriones inmaduros de EBV desprovistos de ADN viral. De forma similar, los sobrenadantes sedimentados de 293/ Δ BFLF1 y 293/ Δ BBRF1 contienen viriones de EBV maduros desprovistos de ADN viral, es decir, representan VLP. Por el contrario, células 293 que contienen genomas de EBV de tipo silvestre muestran partículas de EBV en diversas fases de maduración, algunas de las cuales contienen núcleos densos en electrones que corresponden al ADN de EBV empaquetado. También se descubrió que los viriones de EBV de tipo silvestre aislados de sobrenadantes contenían ADN viral. El análisis de 293/ Δ TR y sus sobrenadantes confirmaron que estas células producen abundantemente VLP como se esperaba.

Ejemplo 4: infección de linfocitos B Raji con los virus Δ BFLF1 y Δ BBRF1

En un intento adicional de caracterizar las propiedades de infección de las estructuras virales producidas por las células 293/ Δ BFLF1 y 293/ Δ BBRF1 inducidas, se incubaron las células Raji con diluciones crecientes 5 veces de sobrenadantes de la línea celular en placas Cluster de 96 pocillos, incluyendo sobrenadante sin diluir. Tres días después de la infección, las células Raji positivas para GFP se contaron usando un microscopio fluorescente. La línea celular Raji B es altamente susceptible a la infección por EBV y expresa la proteína de fluorescencia verde (GFP) tras la infección con el ADN recombinante de EBV. De hecho, el gen GFP se clona en el ADN del EBV recombinante y se expresa tras la infección de las células eucariotas. Después de la incubación de las células Raji con un ml de sobrenadante de 293/ Δ BFLF1 y 293/ Δ BBRF1 inducidas, no se pudo detectar infección por Raji (figura 4). Por el contrario, el mismo volumen de sobrenadantes de las células inducidas 293/EBV de tipo silvestre contenía suficientes virus infecciosos para generar aproximadamente 2×10^4 células Raji positivas para gfp. Los sobrenadantes de las células 293/ Δ TR inducidas fueron dos órdenes de magnitud menos infecciosas que los virus de tipo silvestre, pero sin embargo generaron 120 células positivas para EBV por ml de sobrenadante y, por lo tanto, contenían 120 partículas infecciosas por ml.

Ejemplo 5: detección de proteínas virales y cuantificación de ADN viral en VLP de EBV Δ BFLF1 y Δ BBRF1

Gp350 es un componente principal de las partículas maduras de EBV. Las estructuras virales presentes en los sobrenadantes de 293/ Δ BFLF1, 293/ Δ BBRF1, 293/ Δ TR, 293/WT inducidas se incubaron con anticuerpos específicos para gp350, acoplados a perlas Dynal magnéticas. Las estructuras virales se recogieron después con un imán y las mismas muestras se sometieron a análisis por transferencia de Western y qPCR.

Para el análisis por transferencia de Western (figura 5), las estructuras virales purificadas de un ml de sobrenadante se resuspendieron en PBS y se desnaturalizaron en tampón Laemmli durante 5 minutos a 95 °C. La muestra completa se separó en un gel de SDS-poliacrilamida al 10% y se sometió a electrodeposición sobre una membrana Hybond ECL (Amersham). Después de la preincubación durante 30 minutos en leche en polvo al 5 % en PBS, las transferencias se incubaron con un suero policlonal de conejo contra BNRF1 (Feederle y col. (2006), Epstein-Barr virus BNRF1 protein allows efficient transfer from the endosomal compartment to the nucleus of primary B lymphocytes, J Virol; 80(19): 9435-43) durante 1 hora a temperatura ambiente. BNRF1 es una proteína del tegumento presente en alta concentración en estructuras virales de EBV. Después de varios lavados en Tween al 0,1 % en PBS, las transferencias se incubaron durante 1 hora con proteína A junto con peroxidasa de rábano picante. La unión de anticuerpos se reveló usando un reactivo de detección de ECL (Perkin Elmer). Este experimento confirmó la presencia de estructuras virales positivas para BNRF1 en los tres sobrenadantes ensayados (figura 5).

Para evaluar la presencia de ADN viral (figura 6), la misma cantidad de estructuras virales purificadas con gp350, resuspendidas en PBS, se digirió primero con ADNasa I (5 U/50 μ l de sobrenadante) a 37 °C durante una hora para eliminar cualquier rastro de ADN viral libre contaminante. Después de la inactivación por calor de ADNasa I (10 minutos a 70 °C), las estructuras virales purificadas se mezclaron (1:1 vol/vol) con tampón de lisis (0,1 mg/ml de proteinasa K en agua) y se incubaron durante 60 minutos a 50 °C, después de que la enzima fue inactivada por calor (75 °C durante 20 min). Esta etapa libera cualquier ADN viral empaquetado en partículas virales. Las muestras diluidas en agua (1:10) se sometieron a qPCR usando cebadores y una sonda específica para el gen de la ADN polimerasa (pol) BALF5. Las reacciones de amplificación se realizaron en volúmenes de 25 μ l que contenían 12,5 μ l

de mezcla maestra universal Taqman (Applied Biosystems), 2,5 µl de cebadores de pol directos e inversos (2 µM), 1 µl de sonda pol de 5 µM etiquetada con FAM, 1,5 µl de agua y 5 µl de partículas de virus purificadas y resuspendidas. Después de la activación de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold (10 minutos a 95 °C), las mezclas de reacción se amplificaron durante 40 ciclos (15 segundos a 95 °C, 60 segundos a 60 °C) y las señales fluorescentes se detectaron usando un Sistema de detección de secuencias ABI 7300 (Applied Biosystems). Las secuencias del cebador y de la sonda fueron las siguientes: cebador de pol inverso 5'-AGTCCTTCTTGGCTAGTCTGTTGAC-3' (SEQ ID NO: 29), cebador de pol directo 5'-CTTTGGCGCGGATCCTC-3' (SEQ ID NO: 30), sonda pol EBV 5'-FAM-CATCAAGAAGCTGCTGGCGGCC-TAMRA-3' (SEQ ID NO: 31). El contenido de ADN se calculó usando una dilución en serie de ADN de Namalwa, una línea celular de linfoma de Burkitt humano que contiene dos copias del genoma de EBV por célula, como referencia para la curva patrón. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 6; se descubrió que las estructuras virales purificadas con gp350 de 1 ml de sobrenadantes de tipo silvestre contienen aproximadamente 1×10^6 genomas virales. En controles de medio y agua, el procedimiento de qPCR da una señal en el intervalo de 1×10^3 a 1×10^4 genomas y, por lo tanto, se dibuja una línea basal a 1×10^4 genomas/ml. En marcado contraste con el EBV de tipo silvestre, los sobrenadantes de 293/ΔBFLF1 y 293/ΔBBRF1 inducidas no contenían ningún ADN detectable por encima del EBV inicial. Los sobrenadantes de 293/ΔTR arrojaron resultados intermedios ya que un ml de sobrenadante contenía un poco más de 1×10^4 genomas virales por ml de sobrenadantes. En total, se concluyó que las estructuras virales purificadas con gp350 de 293/ΔBFLF1 y 293/ΔBBRF1 inducidas contienen estructuras virales que transportan la proteína BNRF1 pero no contienen ningún ADN viral, es decir, representan VLP genuinas.

Ejemplo 6 linfocitos B pulsados con VLP de ΔBFLF1 y ΔBBRF1 son reconocidos por linfocitos T específicos de EBV.

Se evaluó la capacidad de las VLP para inducir una respuesta específica de linfocitos T (figura 7). Con este objetivo, se incubaron partículas de virus o VLP presentes en 1 ml de los sobrenadantes de virus indicados purificados usando anticuerpos para gp350 con células LCL que actuaron como células presentadoras de antígeno. Paralelamente, las LCL se pretrataron con las cantidades indicadas de péptido BNRF1 que se usaron como controles positivos. Las LCL pulsadas se incubaron después con linfocitos T CD4+ específicos de BNRF1. El reconocimiento específico de los antígenos presentes en la superficie de las LCL por los linfocitos T CD4+ específicos de BNRF1 provoca la producción y liberación de IFN-gamma en el sobrenadante que puede evaluarse mediante ELISA. Se descubrió que los linfocitos T específicos de BNRF1 reconocen igualmente bien los viriones de EBV de tipo silvestre y las VLP de ΔBFLF1 y ΔBBRF1.

Ejemplo 7 las VLP pueden incorporar proteínas extrañas.

En este contexto se muestra que los dominios intracitoplasmático y transmembrana de la glucoproteína gC del virus del herpes simple pueden usarse para introducir antígenos extraños en las VLP. Por ejemplo, se fusionan estos subdominios de gC en marco con 6 histidinas sucesivas (gC-6xhis) y se transfecta un plásmido que codifica esta proteína de fusión en la línea celular productora ΔBFLF1 al iniciar la replicación lítica de EBV. Las partículas de virus producidas se purificaron usando anticuerpos para gp350 acoplados a Dynabeads. Las proteínas preparadas a partir de estas VLP se analizaron mediante transferencia de Western usando un anticuerpo específico de histidina. Se descubrió que solo los virus que se produjeron en células 293/ΔBFLF1 transfectadas con gC-6xhis dieron lugar a señales específicas y, por lo tanto, han incorporado esta proteína (figura 8).

Ejemplo 8 las VLP que portan antígenos extraños inducen respuestas inmunitarias

Como se ha demostrado que las LP/VLP que se generaron son inmunógenas y cumplen los requisitos de una preparación segura de vacunas, el objetivo de los inventores es ampliar su espectro antigénico. La infección por EBV induce fuertes respuestas de linfocitos T y se han identificado epítomos de linfocitos T tanto de proteínas líticas como latentes de EBV. Se eligió el epítomo inmunodominante 5H11 (SEQ ID NO: 33; secuencia codificante SEQ ID NO: 32) de la proteína EBNA3C latente de EBV para incorporar en la envoltura del virus. Se generó una proteína de fusión (SEQ ID NO: 35; secuencia codificante SEQ ID NO: 34; la construcción está comprendida en el plásmido B599 (SEQ ID NO: 37); el plásmido B557 (SEQ ID NO: 36) es un plásmido de control que carece de secuencia que codifica el epítomo 5H11), que comprende el epítomo 5H11 y partes de la glucoproteína C (gC) del virus del herpes simple 1 (HSV-1) que incluye el péptido señal, el dominio transmembrana y la cola citoplasmática. Además, la construcción contenía una marca de His y un sitio de restricción único para facilitar la inserción del epítomo (figura 9A). La inducción de líneas celulares productoras mutantes en presencia de esta construcción condujo a la incorporación eficiente de la proteína de fusión en LP/VLP de EBV, como lo demuestra la transferencia Western de LP/VLP purificadas por Dynabead (figura 9B). Además, ambas VLP ΔBFLF1/BFRF1A con proteína de fusión gC-His-5H11 incorporada fueron capaces de inducir la activación de linfocitos T específicos después de la presentación de LCL (figura 9C).

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que comprende un genoma del virus de Epstein-Barr (EBV)
 - a) que carece de al menos un gen expresable seleccionado del grupo que consiste en el gen BFLF1 y el gen BBRF1, y
 - b) que es capaz de producir partículas similares al virus de Epstein-Barr (EB-VLP) sustancialmente libres de ADN del virus de Epstein-Barr (EBV) en una célula huésped adecuada.
2. El polinucleótido de la reivindicación 1, que carece además de al menos un gen latente expresable.
3. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 1 o 2.
4. Una célula huésped que comprende el polinucleótido de la reivindicación 1 o 2 o el vector de la reivindicación 3.
5. Un procedimiento para fabricar EB-VLP sustancialmente libres de ADN de EBV, que comprende las etapas de:
 - a) cultivar una célula huésped adecuada que comprende el polinucleótido de la reivindicación 1 o 2 o el vector de la reivindicación 3, y
 - b) obtener EB-VLP sustancialmente libres de ADN de EBV a partir de las células, en el que las EB-VLP sustancialmente libres de ADN del EBV contienen menos de 50 genomas de EBV/10⁶ EB-VLP.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dichas EB-VLP se obtienen a partir del sobrenadante de las células cultivadas.
7. El procedimiento de la reivindicación 5 o 6, que comprende además la etapa de expresar al menos un gen que codifica un polipéptido artificial en dicha célula huésped durante la etapa a).
8. Un procedimiento de fabricación de una vacuna que comprende las etapas del procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 y la etapa adicional de formular las EB-VLP como una vacuna.
9. Una vacuna que contiene EB-VLP sustancialmente libres de ADN de EBV obtenible por el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en la que las EB-VLP sustancialmente libres de ADN de EBV contienen menos de 50 genomas de EBV/10⁶ EB-VLP.
10. Una composición que comprende partículas similares al virus de Epstein-Barr (EB-VLP) sustancialmente libres de ADN del virus de Epstein-Barr (EBV) obtenible por el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en la que las EB-VLP sustancialmente libres de ADN de EBV contienen menos de 50 genomas de EBV/10⁶ EB-VLP.
11. La composición que comprende EB-VLP de la reivindicación 10, comprendiendo dichas EB-VLP además al menos un polipéptido artificial.
12. La composición que comprende EB-VLP de la reivindicación 10 u 11, careciendo dichas EB-VLP de al menos un polipéptido de EBV no esencial.
13. La composición que comprende EB-VLP de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 para su uso como medicamento.
14. Una composición que comprende partículas similares al virus de Epstein-Barr (EB-VLP) sustancialmente libres de ADN de EBV obtenible por el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 para su uso como vacuna para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad, en la que las EB-VLP sustancialmente libres de ADN de EBV contienen menos de 50 genomas de EBV/10⁶ EB-VLP.

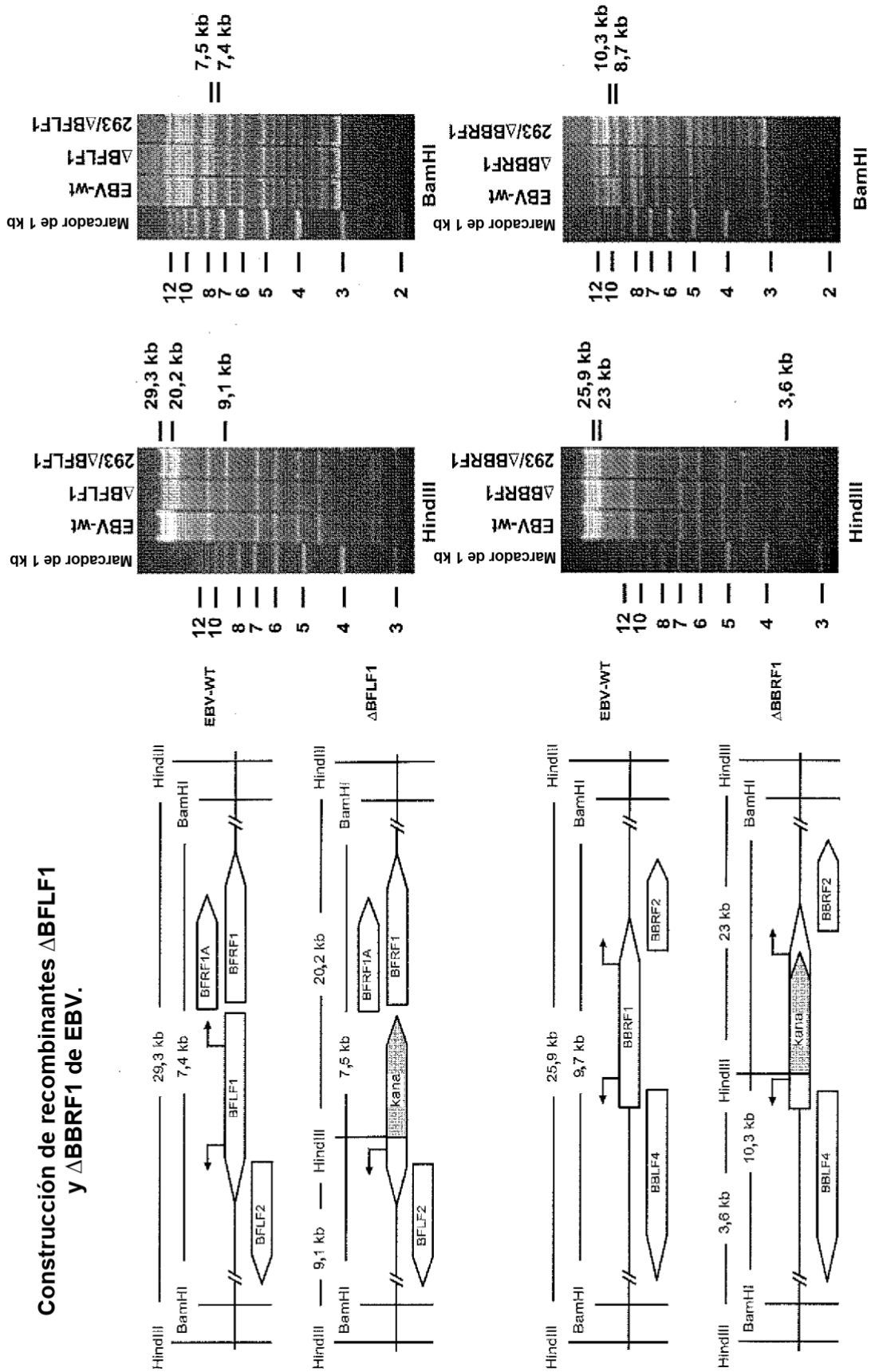


Fig. 1

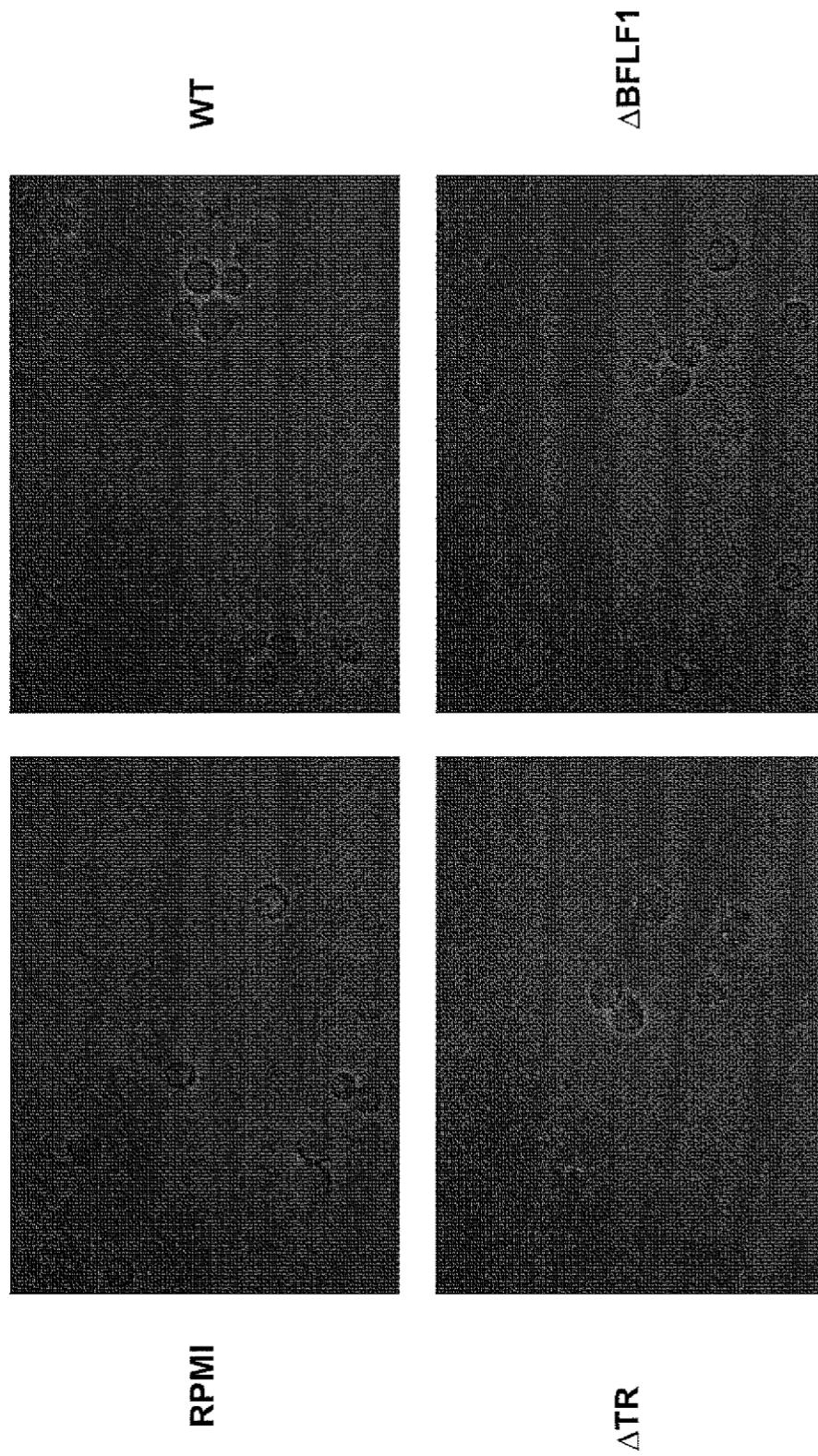


Fig. 2

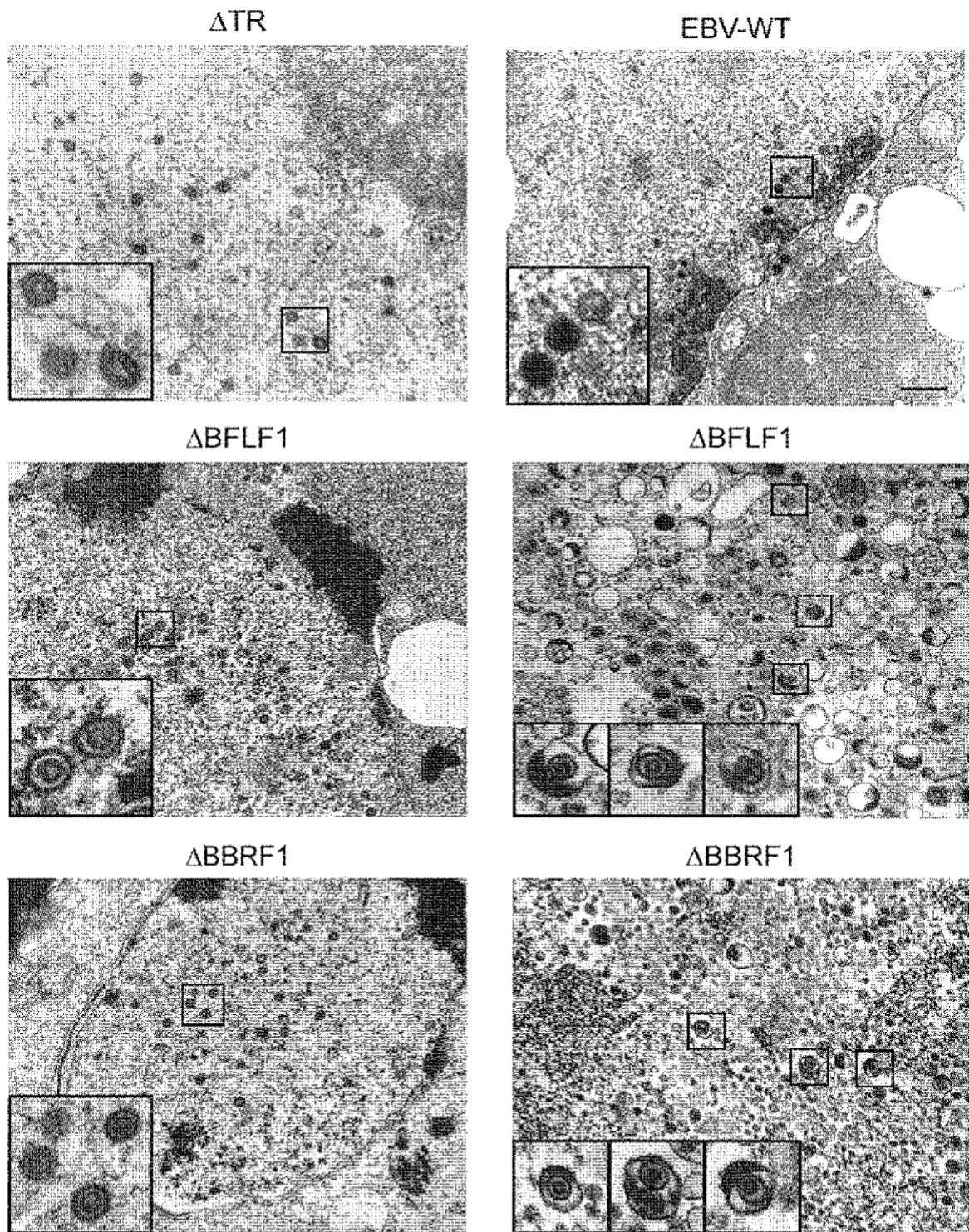


Fig. 3

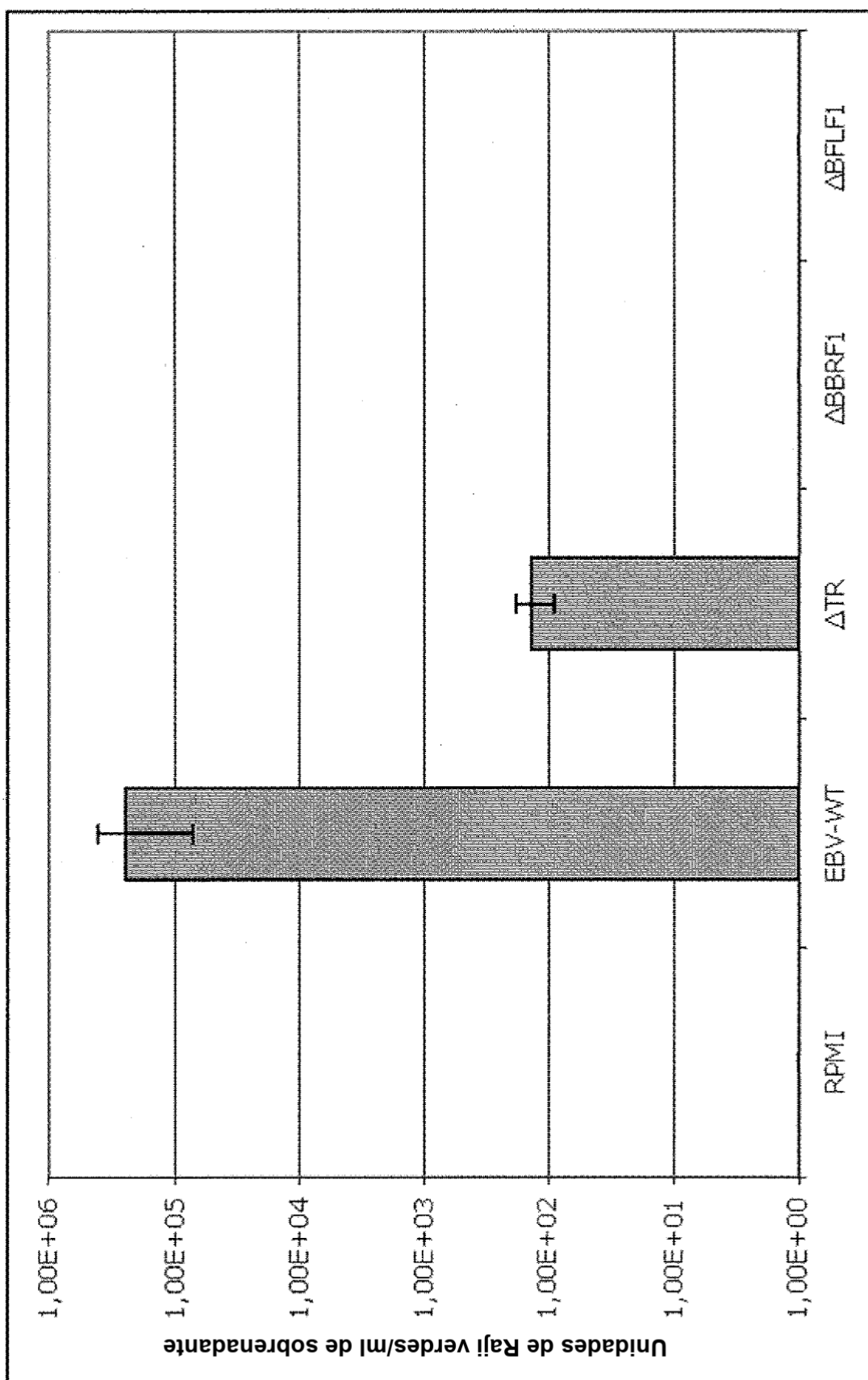


Fig. 4

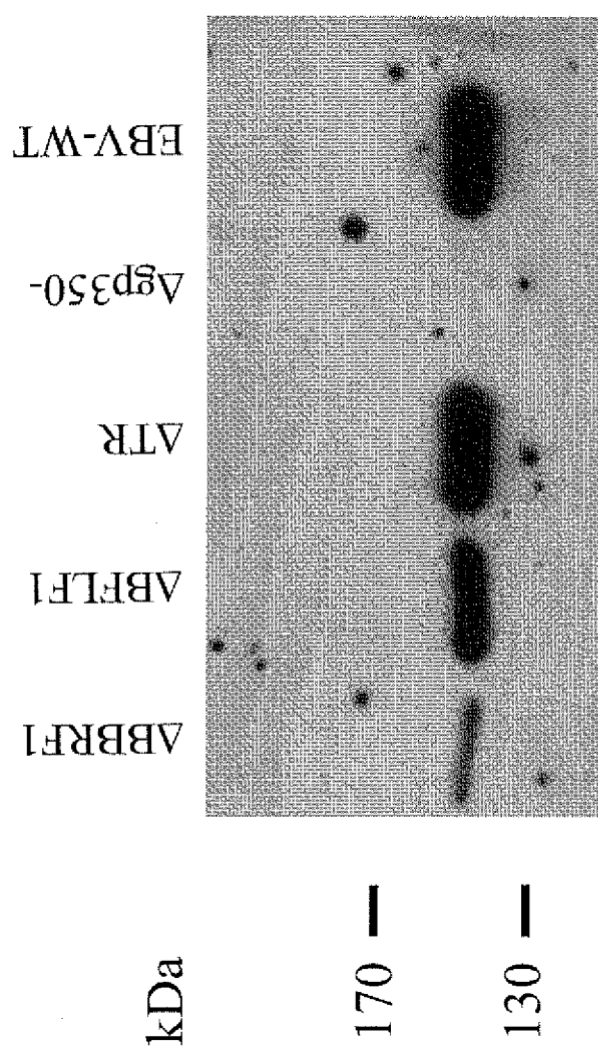


Fig. 5

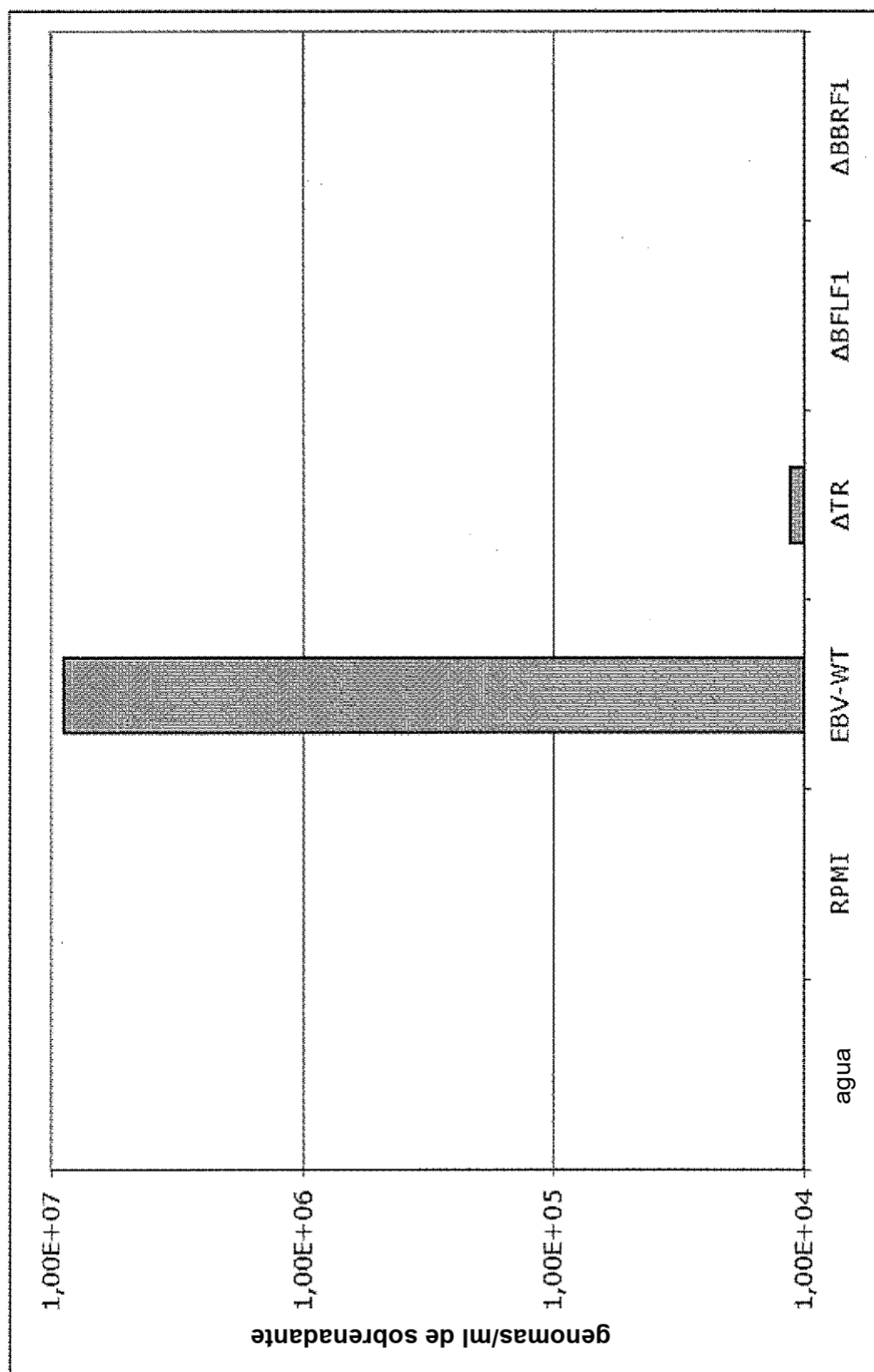


Fig. 6

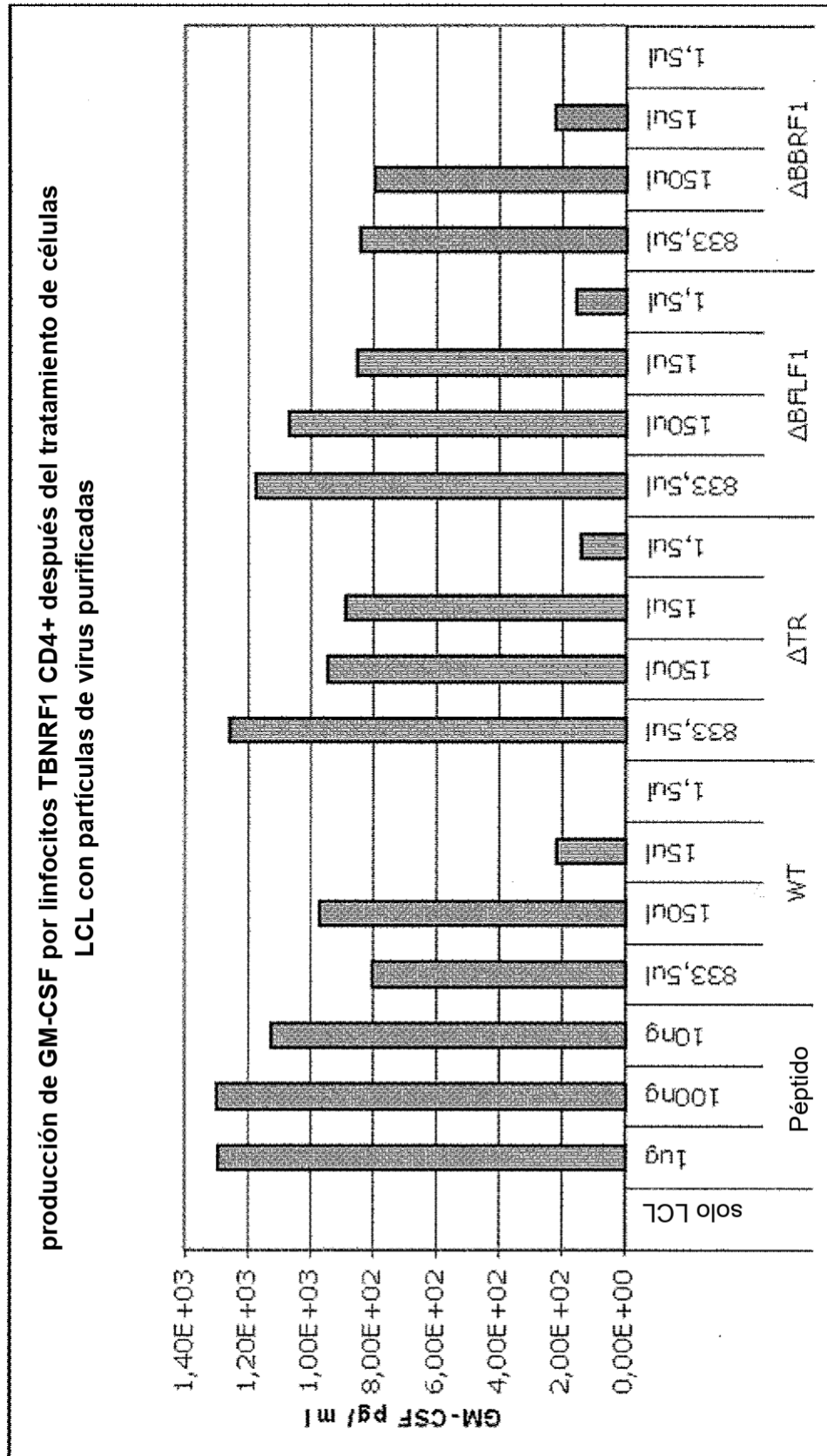


Fig. 7

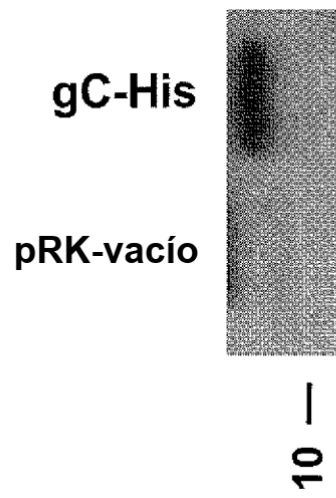


Fig. 8

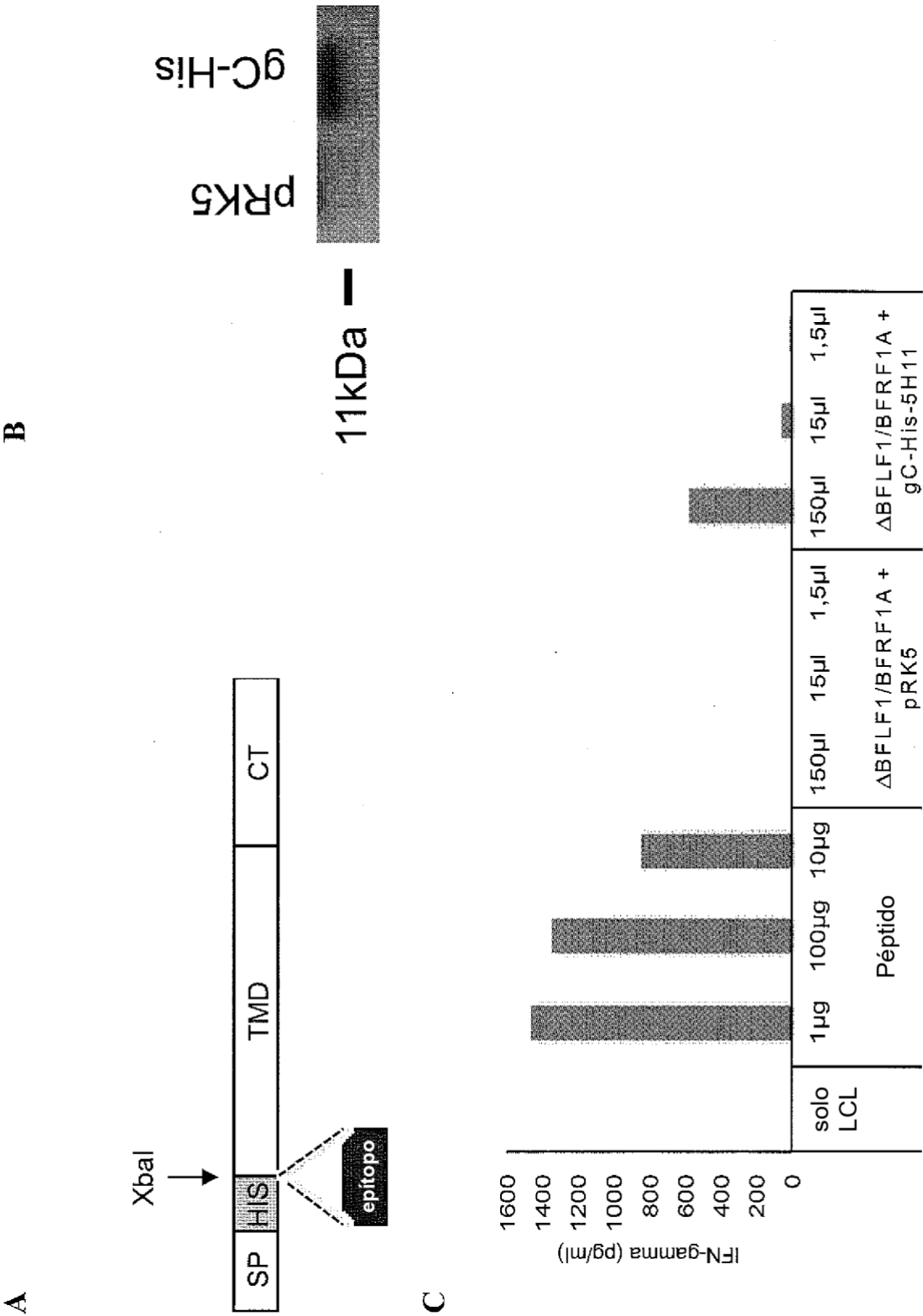


Fig. 9