



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 282 998**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/33** (2006.01)

**C12N 15/35** (2006.01)

**C12N 15/40** (2006.01)

**C07K 14/015** (2006.01)

**A61K 39/295** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96400009 .5**

86 Fecha de presentación : **02.01.1996**

87 Número de publicación de la solicitud: **0783038**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.1997**

54 Título: **Pseudo-partículas víricas recombinantes y aplicaciones vacunales y antitumorales.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.10.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.10.2007**

73 Titular/es: **INSTITUT PASTEUR**  
**28, rue du Docteur Roux**  
**75724 Paris Cédex 15, FR**  
**Immunología y Genética Aplicada, S.A. (Ingenasa)**

72 Inventor/es: **Casal, Ignacio;**  
**Sedlik, Christine;**  
**Sarraseca, Javier y**  
**Leclerc, Claude**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

**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

Pseudo-partículas víricas recombinantes y aplicaciones vacunales y antitumorales.

5 La presente invención se refiere a pseudo-partículas víricas recombinantes de un virus de la familia de *Parvoviridae*, útiles especialmente para inducir respuestas linfocitarias T citotóxicas (CTL) *in vivo* a un nivel elevado.

Tiene también por objeto la utilización de estas pseudo-partículas para la preparación de vacunas o de medicamentos antitumorales.

10 La invención se refiere asimismo a composiciones que comprenden dichas pseudo-partículas en un vehículo y/o un diluyente fisiológicamente aceptable.

15 Según Fernández *et al.* (Médecine/Sciences, 1995, 11, 975-983), la respuesta con mediación celular, esencial en el caso de un tumor, puede dividirse en dos partes:

- por una parte, la implementación de la respuesta que hace intervenir linfocitos TCD4<sup>+</sup> y células presentadoras del antígeno (CPA), y
- 20 - por otra parte, la respuesta efectora citotóxica en la que intervienen los linfocitos TCD8<sup>+</sup>.

Los linfocitos TCD4<sup>+</sup> activados proliferarán y segregarán citoquinas, mientras que los linfocitos TCD8<sup>+</sup> activados proliferarán y se diferenciarán en linfocitos T citotóxicos (CTL).

25 Estas dos familias de linfocitos tienen por lo tanto funciones muy diferentes, y se activan mediante mecanismos distintos. La estimulación de los linfocitos CD4<sup>+</sup> necesita la asociación de un péptido, que procede de la degradación del antígeno, a las moléculas de clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), mientras que la estimulación de las células CD8<sup>+</sup> necesita la asociación de un péptido a unas moléculas de clase I del CMH.

30 Se ha propuesto ya un cierto número de estrategias profilácticas o terapéuticas para luchar contra enfermedades de diversos orígenes en el ser humano y en el animal ocasionadas por virus, bacterias, parásitos, o contra enfermedades cancerígenas o tumorales.

35 Se conoce, por ejemplo, la inducción de respuestas CTL *in vivo* mediante vectores "vivos". Sin embargo, la inocuidad de estos vectores no está garantizada, especialmente en individuos inmunodeprimidos. Por otra parte, los sistemas que implican la replicación de estos vectores "vivos" no conservan su eficacia en individuos inmunes.

Martínez *et al.* dan a conocer en Vaccine (vol. 10, p. 684-690, 1992) el uso de cápsidas vacías de parvovirus de cerdo (PPV) en la vacunación de cerdos. La familia de *Parvoviridae* comprende virus muy distribuidos en mamíferos tales como cerdos, bovinos, gatos, conejos, ratas y en el ser humano. Sin embargo, los parvovirus son relativamente específicos de los mamíferos hospedantes. El parvovirus de cerdo (PPV), en particular, es responsable de numerosas infecciones en la cría industrial de cerdos. El parvovirus de cerdo (PPV) está constituido por una partícula isométrica no recubierta de 20 nm de diámetro y de simetría icosaédrica, que contiene una molécula de ADN de cadena sencilla. Está compuesto de dos proteínas de cápsida, VP1 (83 kDa) y VP2 (64 kDa), y por una tercera proteína, VP3, que resulta de la proteólisis de VP2.

40 La proteína VP2 se puede producir mediante células de insectos con la ayuda de un sistema de baculovirus recombinante, y las proteínas VP2 obtenidas son capaces de autoensamblarse para formar pseudo-partículas víricas que tienen el mismo tamaño que aquel del virión nativo. La vacunación de cerdos contra la PPV se realiza inmunizándolos con una mezcla de dichas cápsidas en asociación con el adyuvante Alhidrogel (al 50%) + Quil A 500 µg (Superfos). Una enseñanza comparable a aquella de este artículo se encuentra en las Solicitudes EP-551.449 y EP-554.414 que indican además que estos epítopos que corresponden a otras proteínas víricas se pueden incorporar a las cápsidas, sin precisar, sin embargo, la naturaleza de estos epítopos.

55 La solicitud EP-647655 se refiere a unos péptidos sintéticos que corresponden a sitios antigénicos de VP2. Por lo tanto, no se trata de la proteína completa.

Sedlik *et al.* describen, en Journal of General Virology (76:2361-2368, (1995)), el uso de partículas híbridas de PPV como vectores de dos epítopos del virus de la polio, C3:B y C3:T reconocidos respectivamente por linfocitos B y TCD4<sup>+</sup>. Las partículas que contienen el epítipo C3:TCD4<sup>+</sup> solamente son capaces de estimular las respuestas proliferativas de células T CD4<sup>+</sup>, y no de células T CD8<sup>+</sup>. Además de esta especificidad de estimulación, las respuestas siguen siendo de un nivel poco elevado, insuficiente para una inmunización eficaz. En cualquier caso, la inducción de estas respuestas requiere obligatoriamente el uso de un adyuvante (hidróxido de aluminio o un adyuvante completo de Freund).

65 Además, los ensayos de modificación de las pseudo-partículas con vistas a incorporar epítopos heterólogos hacen frente a dificultades tales como la inhibición de la formación de las pseudo-partículas. Incluso cuando estas últimas se forman, el epítipo heterólogo no es necesariamente inmunógeno, pudiendo el epítipo situarse, por ejemplo, en un sitio en el que es incapaz de adoptar su conformación natural o ser producido por las células que presentan el antígeno.

Por otra parte, a semejanza de las vacunas con vectores “vivos”, la inocuidad de estas partículas híbridas asociadas a los adyuvantes no está totalmente asegurada, pudiendo una toxicidad provenir de ciertas propiedades de los adyuvantes susceptibles de inducir efectos secundarios perjudiciales para el organismo.

5 Por lo tanto, se desprende del estado de la técnica que no se conoce un sistema fiable, eficaz, que permita estimular la respuesta linfocitaria T citotóxica, sin riesgo para la salud del individuo tratado y sin el uso de adyuvantes inmunoestimulantes.

10 Se ha demostrado que era posible inducir específicamente una respuesta linfocitaria CD8<sup>+</sup>, es decir, una respuesta citotóxica, con la ayuda de pseudo-partículas que llevan epítomos susceptibles de asociarse con por lo menos una molécula de clase I del CMH.

15 La presente invención tiene por objeto pseudo-partículas víricas recombinantes, constituidas mediante autoensamblado de la proteína de estructura vírica VP2 de *Parvoviridae* de cerdo (PPV), que presentan un tamaño comprendido entre aproximadamente 20 y 60 nm, y que forman una estructura aproximadamente icosaédrica, estando dicha proteína modificada en su extremo N-terminal por la presencia de por lo menos un epítomo que comprende una secuencia de 8 ó 9 aminoácidos susceptible de asociarse a una molécula de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), siendo dicha asociación reconocida por unos linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos.

20 La asociación formada entre esta secuencia y las moléculas de clase I es reconocida por el receptor de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, e induce una diferenciación y una proliferación de estos linfocitos.

25 Ventajosamente, dicha secuencia está rodeada de regiones denominadas de flaqueo, susceptibles de modular su degradación, es decir, de facilitar su producción durante la degradación del antígeno, o de facilitar su fijación a las moléculas de clase I del CMH.

Las regiones de flaqueo pueden corresponder a los aminoácidos que flanquean el epítomo T CD8<sup>+</sup> en su ambiente natural. De manera general, pueden estar compuestas por varios aminoácidos, y en particular por alanina o por lisina.

30 Las pseudo-partículas según la invención presentan un primer interés, que proviene de la seguridad de este modo de inmunización, siendo el vector usado no replicativo, constituido por un único tipo de proteína vírica, y pudiendo ser administrado incluso a individuos inmunodeprimidos.

35 Una segunda ventaja de las pseudo-partículas según la invención reside en la ausencia de reacciones cruzadas con el parvovirus humano y, por lo tanto, en la ausencia de problemas relacionados con una pre-inmunización de los individuos, lo que lleva eventualmente a una inmunogenicidad débil de este tipo de vacunas recombinantes.

40 Además, las pseudo-partículas según la invención no necesitan la replicación del vector y, por lo tanto, pueden conservar su eficacia en los individuos inmunes.

Asimismo, las pseudo-partículas según la invención presentan una excelente inmunogenicidad -una sola inmunización es suficiente- y, por lo tanto, se pueden utilizar en ausencia de adyuvante inmunoestimulante.

45 El epítomo puede estar constituido por cualquier secuencia que se fija a una molécula del CMH de clase I y susceptible de inducir una citotoxicidad T linfocitaria. En particular, se puede tratar de un epítomo TCD8<sup>+</sup> de un virus, tal como el VIH-1 o el VIH-2, o el virus de la gripe, o un epítomo tumoral o expresado por células cancerígenas.

50 Según un modo ventajoso de realización, las pseudo-partículas según la invención se caracterizan porque el epítomo seleccionado es el epítomo CTL CD8<sup>+</sup> contenido en la región 118-132 de la nucleoproteína del virus de la coriomeningitis linfocitaria.

Sin embargo, el epítomo puede ser cualquier otro epítomo susceptible de inducir una respuesta CTL, tal como, por ejemplo, uno de los siguientes epítomos:

- 55 - los epítomos de las proteínas Env gp120, Env gp41, Gag p17, Gag p24, Gag p15, Pol y Nef, de los virus del VIH y los epítomos de las proteínas Gag, y nef del virus VIS y Gag del virus VIH-2, tales como los definidos por VENET y WALKER (AIDS 1993, Vol. 7, supl. 1, 119-120).
- 60 - los epítomos de proteínas expresadas por tumores que se desarrollan en el ser humano, tales como las proteínas expresadas por los genes MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1.2, HER-2/neu, y por antígenos de diferenciación melanocítica, tales como la tirosinasa, Pmel17gp100, Melan-A<sup>MART-1</sup>, y gp<sup>75TRP1</sup>, definidos por VAN DEN EYNDE y BRICHARD (Current Opinion in Immunology, 1995, 7, 674-681).

65 Ventajosamente, dichas pseudo-partículas víricas recombinantes son susceptibles de ser obtenidas mediante un procedimiento que comprende una etapa de expresión, en el baculovirus de la proteína quimérica constituida por la proteína VP2 del PPV y de dicho epítomo.

Las pseudo-partículas según la invención se obtienen, más preferentemente, mediante autoensamblado de la proteína VP2 de PPV modificada por la presencia, en su extremo N-terminal, de por lo menos un epítipo de la nucleoproteína de LCMV.

5 La presente invención tiene también por objeto la utilización de las pseudo-partículas en cantidad inmunizante eficaz, para la inducción de respuestas CTL *in vivo* a un nivel elevado.

Mediante la expresión “cantidad inmunizante eficaz” se entiende una cantidad, seleccionada en función de la vía de administración y del peso del individuo, de pseudo-partículas según la invención. Ventajosamente, la cantidad  
10 administrada estará comprendida entre 10 y 500  $\mu\text{g}$  de pseudo-partículas por individuo.

La presente invención tiene además por objeto una composición que comprende las pseudo-partículas en un vehículo y/o un diluyente inmunológicamente aceptables. Como diluyente, se puede usar una disolución acuosa tamponada aproximadamente a pH 7 (disolución fisiológica).  
15

Ventajosamente, la composición según la presente invención está exenta de adyuvante inmunoestimulante. Sin embargo, puede contener, si es necesario, dicho adyuvante, que puede ser hidróxido de aluminio.

Las pseudo-partículas según la presente invención también se pueden usar en un procedimiento de estimulación  
20 *in vitro* de las respuestas T citotóxicas de linfocitos que provienen de sujetos que sufren de infecciones víricas o tumorales, que comprende la puesta en contacto de los linfocitos de los sujetos con las pseudo-partículas. En este caso, las células se readministran, después del tratamiento, a los pacientes, por ejemplo, mediante inyección.

La presente invención tiene asimismo por objeto la utilización de las pseudo-partículas según la invención en la  
25 preparación de una vacuna, preferentemente de dosis única, especialmente antitumoral o antivírica. Se puede administrar por las vías habituales para las vacunas, a saber, por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea, o eventualmente por vía oral o cualquier otra vía que permita la activación de una respuesta CTL.

La invención se ilustra sin estar limitada de ningún modo mediante la siguiente descripción, haciendo referencia a  
30 los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 que comprende tres gráficos 1(a), 1(b) y 1(c) ilustra la inmunización de ratones, en dos tomas, el día 0 y el día 21 con 10 y 50  $\mu\text{g}$  respectivamente de pseudo-partículas según la invención, sin adyuvante. El día 28, los esplenocitos se estimulan *in vitro* durante 5 días con los esplenocitos singénicos preincubados con el péptido  
35 sintético 118-132. La actividad linfocitaria T citotóxica se mide sobre las dianas P815 preincubadas con el medio o con el péptido sintético 118-132. Los resultados se expresan en % de lisis, estando la relación E:T indicada en abscisas, designando esta expresión E/T la relación de linfocitos efectores/células diana. La figura 1(a) se refiere a los resultados obtenidos con la partícula PPV-29LCMV, la figura 1(b) se refiere a los resultados obtenidos con la partícula PPV-30LMCV, y la figura 1(c) a título comparativo con las pseudo-partículas no modificadas.  
40

La figura 2, que comprende 7 gráficos 2(a), 2(b), 2(c), 2(d), 2(e), 2(f) y 2(g), ilustra la inmunización de ratones, en dos tomas, el día 0 y el día 21, con diferentes dosis respectivamente de 50  $\mu\text{g}$  para la figura 2(a), 10  $\mu\text{g}$  para la figura 2(b), 2  $\mu\text{g}$  para la figura 2(c), 0,4  $\mu\text{g}$  para la figura 2(d), 0,08  $\mu\text{g}$  para la figura 2(e), de pseudo-partículas  
45 según la invención, sin adyuvante. El día 28, los esplenocitos se estimulan *in vitro* durante 5 días con los esplenocitos singénicos pre-incubados con el péptido sintético 118-132. La actividad linfocitaria T citotóxica se mide sobre dianas P815 preincubadas con el medio o con el péptido sintético 118-132. Los ratones testigo recibieron una inyección en el día 21 de 100  $\mu\text{g}$  de péptido sintético 118-126 de adyuvante incompleto de Freund (IFA) (figura 2g) o de pseudo-partículas testigo (figura 2f). Los resultados se expresan en % de lisis, de la misma manera que en la figura 1.

La figura 3 que comprende, de manera similar a la Figura 1, tres gráficos 3(a), 3(b) y 3(c), ilustra la inmunización  
50 de ratones mediante una única inyección de 10  $\mu\text{g}$  o de 50  $\mu\text{g}$  de pseudo-partículas según la invención, sin adyuvante. En el día 14, los esplenocitos se estimulan *in vitro* durante 5 días con esplenocitos singénicos preincubados con el péptido sintético 118-132. La actividad linfocitaria T citotóxica se mide sobre dianas P815 preincubadas con el medio o con el péptido sintético 118-132. Los resultados se expresan en % de lisis, de la misma manera que en la Figura 1.  
55

La figura 4 que comprende dos gráficos 4(a) y 4(b), ilustra la protección de ratones BALB/c, inyectados por vía intraperitoneal (i.p.) los días 0 y 21 con PBS, o con pseudo-partículas vacías (PPV) o que expresan la secuencia 118-132 de la nucleoproteína del LCMV (PPC-LCMV), o con el virus de cepa Armstrong (LCMV-Arms), contra la infección  
60 mediante LCMV respectivamente los días 28 (4a) y 70 (4b). Los ratones fueron infectados por vía intracerebral con  $10^{1.7}$  PFU/ratón. La mortalidad de los ratones se monitoriza diariamente durante 10 días, y los resultados se expresan en % de supervivencia entre los animales de cada lote.

#### Ejemplo

#### 65 Inducción de la citotoxicidad T linfocitaria por pseudo-partículas según la invención

El epítipo CTL heterólogo, CD8<sup>+</sup>, contenido en la región 118-132 de la nucleoproteína de LCMV, se introdujo en el gen de VP2 del PPV sin alterar la formación ulterior de las pseudo-partículas. Se obtuvieron dos partículas, PPV-

29 LCMV y PPV-30 LCMV, que se diferencian únicamente por un codón de iniciación. Estas proteínas quiméricas se produjeron mediante un sistema de baculovirus, y se purificaron mediante precipitación con sulfato de amonio a partir del lisado de células de insectos, según el método descrito en Journal of General Virology 76: p. 2361-2368 (1995).

- 5 La capacidad de estas partículas recombinantes para inducir respuestas linfocitarias T citotóxicas se analizó *in vivo* en el ratón BALB/c.

#### *Materiales y Métodos*

- 10 \* *Inserción del epítipo LCMV CD8<sup>±</sup> en el sitio XhoI del extremo N-terminal de VP2*

Se sintetizaron dos oligonucleótidos que codifican el epítipo CD8<sup>±</sup> y el codón de iniciación, y que comprenden dos sitios XhoI. Presentan las siguientes secuencias:

15 **5' TCGAGATGCGACCACAAGCTTCAGGAGTATACATGGGAAACCTAACAG  
CACAAAC3'**

20 **5' TCGAGTTGTGCTGTTAGGTTTCCCATGTATACTCCTGAAGCTTGTGGT  
CGCATC3**

- 25 Estos dos oligonucleótidos complementarios se proporcionaron por MedProbe (Noruega). Se fosforilaron con la ayuda del polinucleótido T4 quinasa, se hibridaron a 70°C durante 15 minutos y se ligaron en el sitio XhoI del plásmido pPPV29mod digerido por XhoI; que contiene el gen que codifica la PPV-VP2.

- 30 Se transformaron células DH5 de *Escherichia coli* con la mezcla de ligación, y se extendieron sobre el medio LB que contiene 100 µg/ml de ampicilina. Se seleccionaron los recombinantes que contienen la inserción LCMV, y se secuenciaron a continuación mediante el procedimiento con dideoxi, a fin de determinar la orientación y la integridad de las secuencias insertadas. El clon recombinante que contiene la secuencia LCMV en la orientación adecuada se denominó pPPV29mod/LCMV.

- 35 \* *Construcción de vectores de transferencia en los baculovirus y selección de los baculovirus recombinantes*

- 40 La secuencia VP2 quimérica se obtuvo a partir del vector pPPV29mod/LCMV mediante digestión por BamHI, y se subclonó en el único sitio de restricción BamHI del vector de transferencia del baculovirus PacYM1.

- 45 Se prepararon clones recombinantes tal como se ha descrito anteriormente, y se analizaron mediante el método de minipreparación de ADN plasmídico y mediante cartografía de restricción. Las secuencias de inserción de los clones positivos se secuenciaron nuevamente a fin de verificar de nuevo la integridad del epítipo insertado, así como de las secuencias de flanco. Finalmente, el ADN purificado mediante fenol se precipitó con dos volúmenes de etanol. El clon recombinante así obtenido se denominó pAcYM1/LCMV/ppv29mod.

- 50 A fin de obtener baculovirus recombinantes, se añadió una mezcla de 2 µg de ADN de vector de transferencia purificado y de 500 ng de ADN parental AcRP321acz+ a células de insectos Sf9 en presencia del reactivo de transfección DOTAP (Boehringer Mannheim), según las instrucciones de esta compañía. La transfección se prosiguió hasta que el efecto citopático fue total. Después de 9 días, los cultivos se recuperaron, y se usó el sobrenadante clarificado para el aislamiento de placas de baculovirus recombinantes según los métodos ya conocidos por el experto en la técnica y descritos por Sedlik *et al.* (J. Gen. Virol. 1995, 76, 2361-2368). Los clones recombinantes se seleccionaron usando su fenotipo diana (placa blanca: recombinante, placa azul: fenotipo salvaje).

- 55 Los baculovirus recombinantes se purificaron hasta que no se pudiera detectar ninguna placa azul. Se prepararon lotes de virus que presentan un título importante de baculovirus recombinante AcNPV.PPV-LCMV (>10<sup>8</sup>).

- 60 Un clon, denominado AcPP29-LCMV, se depositó el 20 de diciembre de 1995 con el n° V 95122022 ante la European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC).

- \* *Análisis de las proteínas recombinantes*

- 65 Las células Sf9 se infectaron con los baculovirus recombinantes a razón de una tasa de infección de 1 pfu por célula (unidad formadora de placa por célula), y los extractos de las células se recogieron 72 horas después de la infección.

Se agregó tampón de disociación de proteína a cada extracto celular, y las mezclas se calentaron a 100°C durante 5 minutos, y se separaron a continuación sobre SDS PAGE al 9%.

## ES 2 282 998 T3

Los geles se colorearon con ayuda de azul de Coomassie o se transfirieron sobre membranas de nitrocelulosa con la ayuda de un equipo semiseco, a 22 voltios durante 30 minutos.

Las membranas se incubaron con suero de ratón dirigido contra el epítipo LCMV CD8<sup>+</sup> (dilución 1/200), durante dos horas a temperatura ambiente.

Después del lavado, los anticuerpos fijados se detectaron mediante la proteína A conjugada con peroxidasa (dilución 1/2000) usando 4-cloronaftol como sustrato, hasta el desarrollo del color. Después, las membranas se enjuagaron con agua destilada a fin de detener la reacción. Después de la coloración de los geles de SDS mediante azul de Coomassie, se detectó una banda visible de 67 kD en los extractos de células Sf9 infectadas con los baculovirus recombinantes. El tamaño observado corresponde al tamaño esperado para la proteína quimérica VP2-LCMV. La identidad de esta proteína se confirmó mediante inmunotransferencia. El antisuero de ratón específico muestra una reacción positiva muy clara con la proteína de 67 kD de los extractos celulares infectados. La localización intracelular de la proteína recombinante se analizó mediante inmunotransferencia de diferentes fracciones celulares. Esto permitió demostrar que la proteína quimérica LCMV-VP2 es una proteína citoplásmica soluble.

### \* Purificación de las partículas

Se infectaron células Sf9 con la ayuda de baculovirus recombinante a una tasa de infección de 1 pfu por célula. Las células se recogieron 72 horas después de la infección, se lavaron con PBS y se lisaron mediante choque osmótico a 4°C en una disolución de bicarbonato de 25 mM. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a baja velocidad. Las partículas contenidas en los extractos se purificaron entonces por precipitación mediante una disolución saturada de sulfato de amonio al 20%. El precipitado se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos, se resuspendió en PBS y se dializó durante una noche con este mismo tampón. La identidad y las propiedades de las partículas se confirmaron mediante SDS-PAGE, inmunotransferencia y mediante microscopía electrónica.

Estas partículas purificadas se usaron para la inmunización e inducción de la citotoxicidad linfocitaria (CTL).

### \* Inmunización de los ratones

Los ratones reciben por vía intraperitoneal una inyección de una composición que contiene las pseudo-partículas víricas recombinantes según la invención (PPV-LCMV), o vacías (PPV), en ausencia de adyuvante. Los testigos positivos son ratones inyectados, en el día 21, por vía subcutánea con el péptido sintético 118-126 (proporcionado por la compañía Neosystem, Estrasburgo, Francia) en adyuvante incompleto de Freund (IFA). Testigos negativos reciben pseudo-partículas que no expresan el epítipo LCMV.

### \* Inducción de células citotóxicas

Se extraen los bazo de los ratones inmunizados 7 a 14 días después de la última inmunización. Se cultivan 25x10<sup>6</sup> células inmunes, en presencia de 25x10<sup>6</sup> esplenocitos irradiados que proceden de ratones singénicos no sometidos a tratamiento previo, en frascos que contienen el medio de cultivo nutritivo (RPMI 1640, 10% de suero fetal bovino, glutamina y antibiótico) durante 5 días a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%.

Las células estimuladoras se sensibilizan *in vitro* con el péptido sintético 118-126 a 0,5 µM o con el péptido sintético 118-132 (suministrado igualmente por la compañía Neosystem, Estrasburgo, Francia) a 0,5 µM.

### \* Ensayo de citotoxicidad

La actividad citotóxica de los linfocitos efectores se midió después de 5 días. Las células diana P815 se preincubaron con el medio nutritivo (testigo negativo), o bien con el péptido antigénico sintético, y se marcaron simultáneamente con el <sup>51</sup>Cr durante 1h, a 37°C. A continuación, los linfocitos efectores se incuban con las células marcadas, a diferentes relaciones de efector/diana (relación E/T) en medio nutritivo en placas de 96 pocillos de fondo redondo, durante 4 a 5 horas, a 37°C. Las dianas se incubaron en las mismas condiciones con medio, para medir la liberación espontánea de <sup>51</sup>Cr, y con ácido clorhídrico 1N, para medir la liberación máxima de <sup>51</sup>Cr. La actividad de los linfocitos citotóxicos se determina mediante recuento de la radioactividad presente en los sobrenadantes de cultivo, correspondiente a la liberación de <sup>51</sup>Cr por las células diana lisadas.

$$\% \text{ de lisis específica} = \frac{\text{cpm experimental} - \text{cpm espontáneo}}{\text{cpm máximo} - \text{cpm espontáneo}}$$

Este cálculo se realiza con las células diana incubadas en el medio nutritivo (P815) y con las células diana incubadas con el péptido sintético (P815 + p118-132), como se ha representado mediante las curvas de las Figuras 1 y 3.

## 65 Resultados

Como se puede constatar a partir del examen de las Figuras 1 a 3, una única inyección de 10 µg de pseudo-partículas recombinantes que presentan el epítipo T, CD8<sup>+</sup> de LCMV permitió alcanzar prácticamente 100% de lisis,

## ES 2 282 998 T3

es decir, tanto como el testigo positivo péptido sintético p118-I26 + FIA, lo que confirma que las pseudo-partículas según la invención permiten la inducción de respuestas CTL *in vivo* a un nivel elevado sin adición de adyuvante.

5 Esta inducción es específica del epítipo insertado, ya que no se obtiene ninguna respuesta T citotóxica cuando los ratones se inmunizan mediante dosis equivalentes de pseudo-partículas que no expresan el epítipo LCMV. Las células T citotóxicas así inducidas lisan específicamente las células diana P815 recubiertas por el péptido correspondiente al epítipo insertado.

10 La figura 4 muestra por su parte que los ratones a los que se les inyectaron las pseudo-partículas están protegidos contra la infección vírica a los 28 días, y que 4/5 ratones están protegidos a los 70 días.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Pseudo-partículas víricas recombinantes, **caracterizadas** porque están constituidas por autoensamblado de la proteína de estructura vírica VP2 de parvovirus de cerdo (PPV), porque presentan un tamaño comprendido entre 20 y 60 nm, y porque dicha proteína VP2 está modificada, en su extremo N-terminal, por la presencia de por lo menos un epítipo que comprende una secuencia de 8 ó 9 aminoácidos susceptible de asociarse con una molécula de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad, siendo dicha asociación reconocida por linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos.

2. Pseudo-partículas según la reivindicación 1, **caracterizadas** porque dicho epítipo es un epítipo de la nucleoproteína del virus de la coriomeningitis linfocitaria.

3. Pseudo-partículas según una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizadas** porque dicho epítipo es el epítipo CTL CD8<sup>+</sup> contenido en la región 118-132 de la nucleoproteína del virus de la coriomeningitis linfocitaria.

4. Pseudo-partículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizadas** porque son susceptibles de ser obtenidas mediante un procedimiento que comprende una etapa de expresión en el baculovirus de la proteína híbrida formada por la proteína VP2 de parvovirus y de dicho epítipo.

5. Composición que comprende pseudo-partículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en un vehículo y/o un diluyente fisiológicamente aceptable.

6. Composición según la reivindicación 5, **caracterizada** porque no comprende adyuvante inmunoestimulante.

7. Utilización de las pseudo-partículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o de una composición según la reivindicación 5, para la preparación de medicamentos o de vacunas para la inducción de respuestas CTL *in vivo*.

8. Utilización según la reivindicación 7, para la preparación de vacunas antivíricas o de medicamentos antitumorales.

9. Procedimiento de estimulación *in vitro* de las respuestas T citotóxicas de linfocitos que proceden de sujetos que padecen infecciones víricas o tumorales, que comprende la puesta en contacto de los linfocitos de los sujetos con las pseudo-partículas según una de las reivindicaciones 1 a 4.

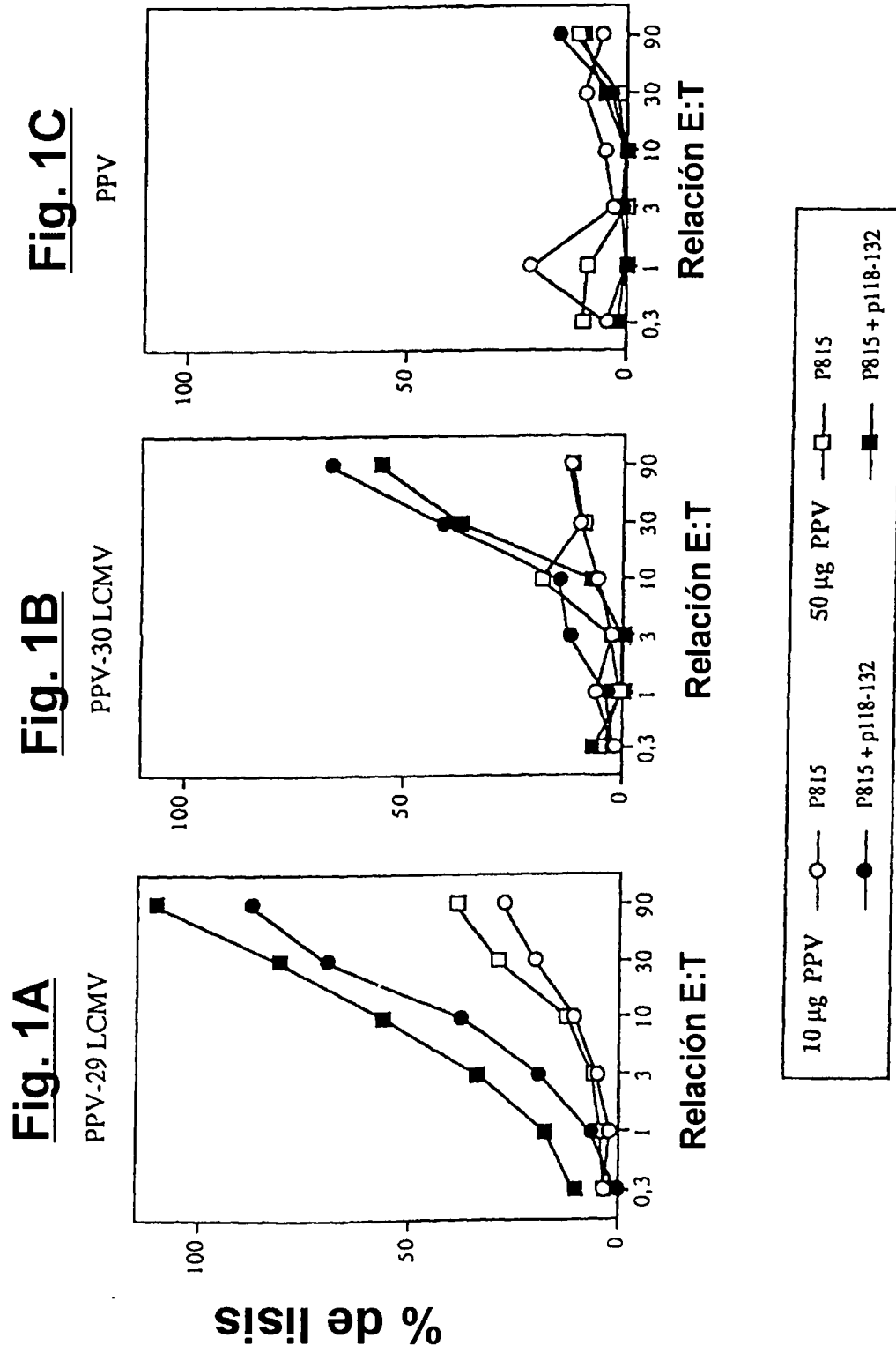


**Fig. 2A**

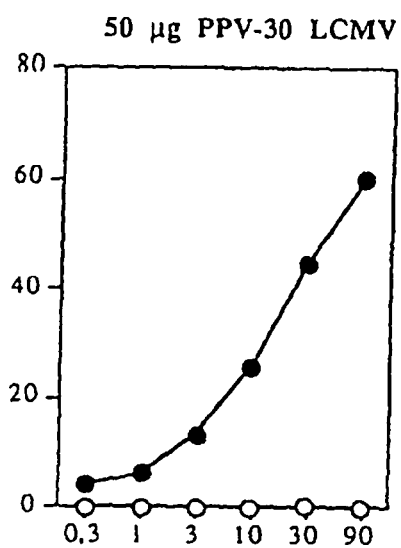


**Fig. 2B**

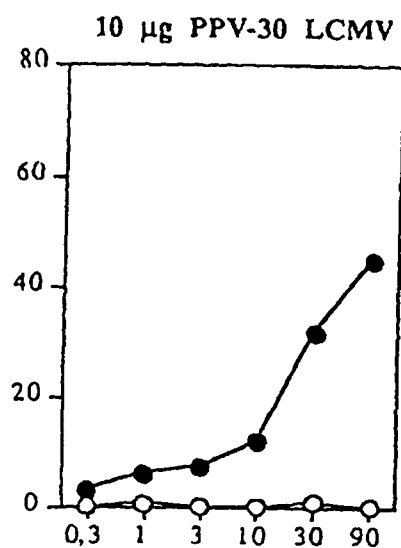


**Fig. 2C**

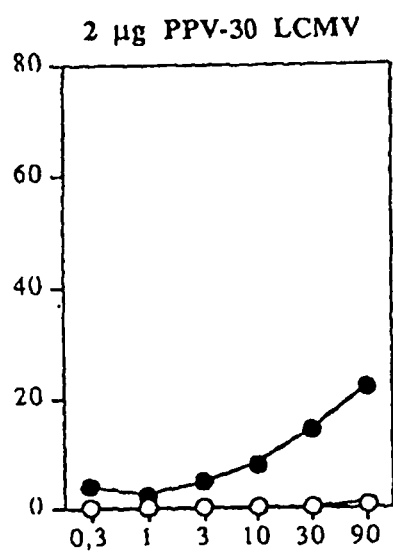


**Fig. 2D**

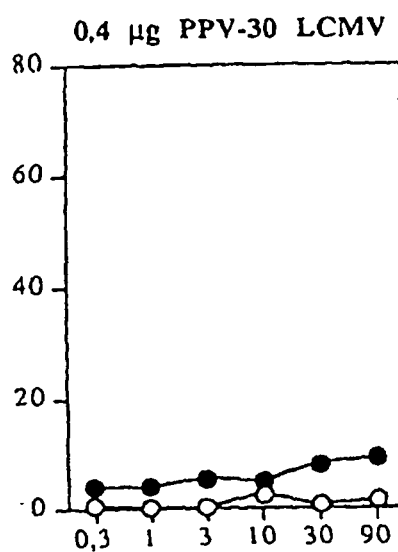


**Fig. 2E**

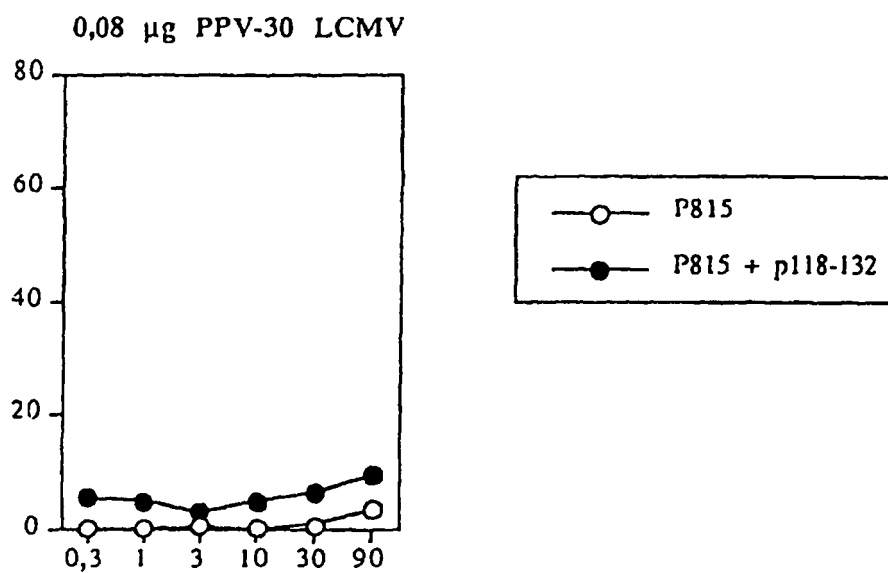


**Fig. 2F**

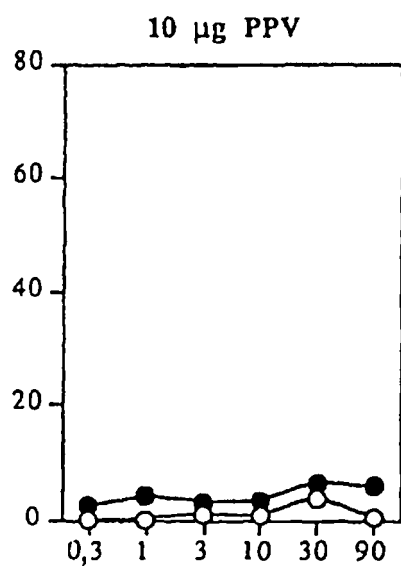
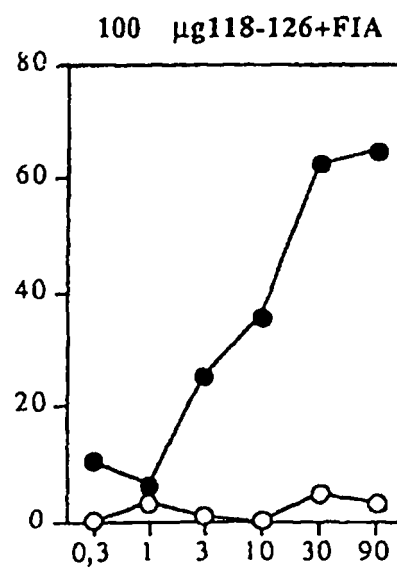


**Fig. 2G**



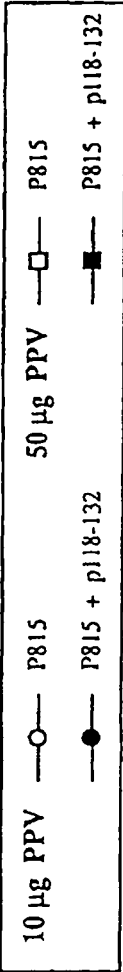
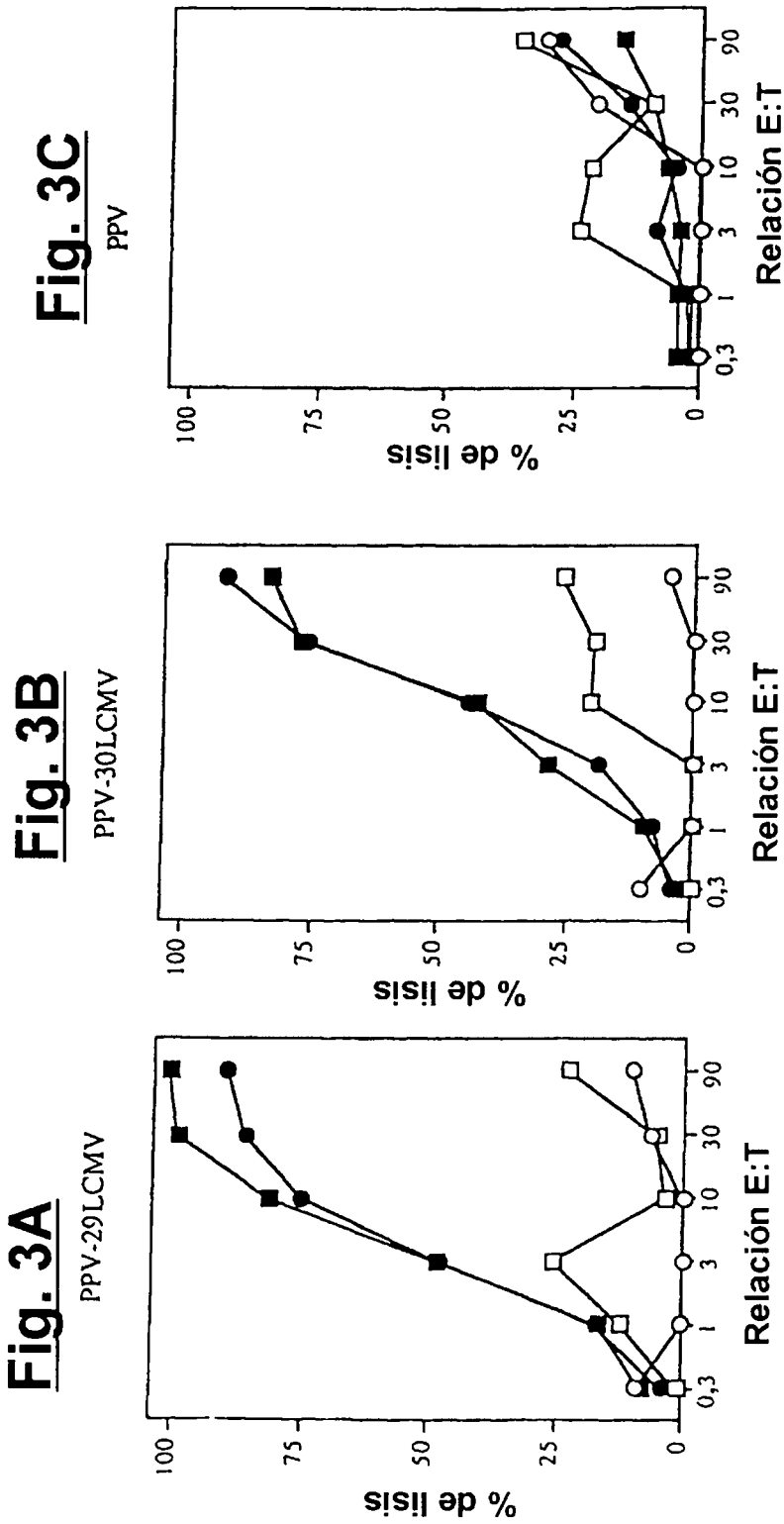


**Fig. 4A**

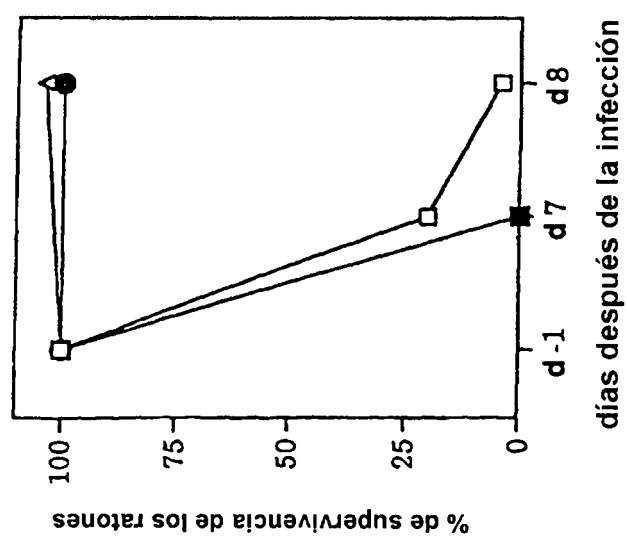
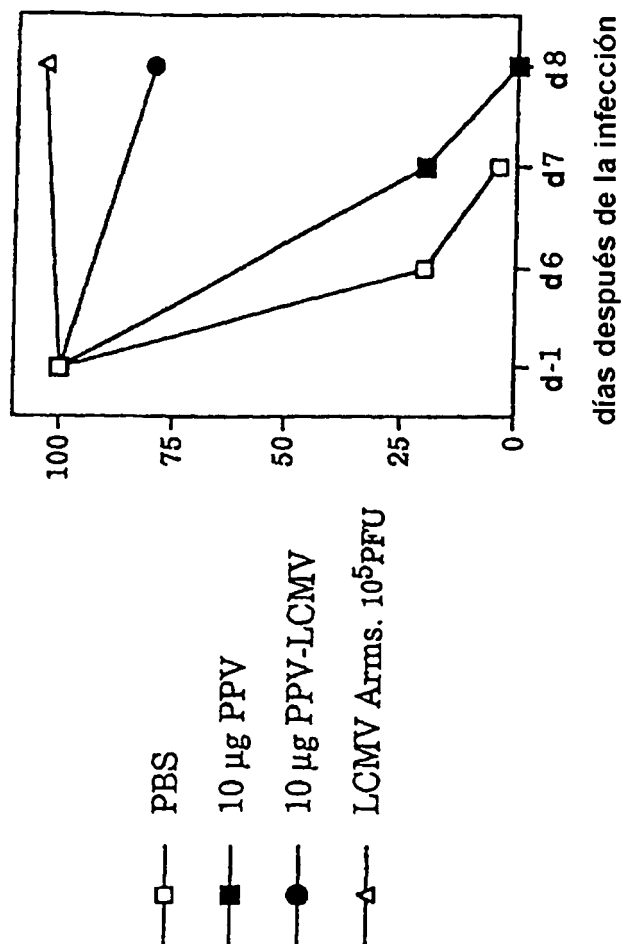


**Fig. 4B**



**LISTA DE SECUENCIAS**

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

- (A) NOMBRE: INSTITUT PASTEUR
- (B) CALLE: 25-28, rue du Docteur Roux
- (C) CIUDAD: PARIS
- (E) PAÍS: FRANCIA
- (F) CÓDIGO POSTAL: 75724 PARIS
- (G) TELÉFONO: 45 68 80 93
- (I) FAX: 250 609

- (A) NOMBRE: IMMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.
- (B) CALLE: Hermanos Garcia Noblejas, 4120
- (C) CIUDAD: MADRID
- (E) PAÍS: ESPAÑA
- (F) CÓDIGO POSTAL: E-28037

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: PSEUDO-PARTÍCULAS VÍRICAS RECOMBINANTES Y APLICACIONES VACUNALES Y ANTITUMORALES

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2

(iv) MEDIO LEGIBLE POR ORDENADOR

- (A) TIPO DE SOPORTE: Disquete
- (B) ORDENADOR: PC compatible IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) PROGRAMA: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30 (OEB)

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 54 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) TIPO FILAMENTO: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº:1

TCGAGATGCG ACCACAAGCT TCAGGAGTAT ACATGGGAAA CCTAACAGCA CAAC

54

(2) INFORMACIÓN PARA SEC ID nº: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 54 pares de bases
- (B) TIPO: nucleótido
- (C) TIPO FILAMENTO: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: ADN (genómico)

## ES 2 282 998 T3

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID nº:2

5           TCGAGTTGTG CTGTTAGGTT TCCCATGTAT ACTCCTGAAG CTTGTGGTCG CATC           54

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65