



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 334 528**

② Número de solicitud: 200700278

⑤ Int. Cl.:  
**C12N 15/10** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**C12N 15/81** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **23.01.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **11.03.2010**

Fecha de la concesión: **12.01.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **24.01.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**24.01.2011**

⑰ Titular/es: **Alberto García Quintanilla  
c/ Atanasio Barrón, 14 - Portal 4 – 5º A  
41003 Sevilla, ES**

⑱ Inventor/es: **García Quintanilla, Alberto**

⑳ Agente: **No consta**

㉔ Título: **Proceso para generar diversidad *in vivo* con uso diagnóstico, terapéutico o vacunal.**

㉕ Resumen:

Proceso para generar diversidad *in vivo* con uso diagnóstico, terapéutico o vacunal.

Se describe un proceso para generar diversidad *in vivo* con uso diagnóstico, terapéutico o vacunal. Para ello se emplea una levadura que contiene el ARN de interés sobre el que se quiere obtener diversidad y las proteínas necesarias para replicarlo con una ARN polimerasa dependiente de ARN que introduce mutaciones y para empaquetarlo de forma heteróloga en partículas similares a virus. La población de los nuevos ARN sintetizados contiene variantes del original que son igualmente traducidas y sometidas a nuevas rondas de empaquetamiento y replicación. La presencia de la pared celular evita que las partículas similares a virus lisen la célula y se puedan transmitir de una generación a otra por citoducción. La diversidad así generada es acumulativa en el tiempo y limitada únicamente al ARN de interés, dejando estable el resto del genoma del vehículo. El proceso ofrece además la posibilidad de secretar los productos generados al exterior o mantenerlos unidos a la pared celular, y de monitorizar la diversidad generada tanto genotípicamente como fenotípicamente.

ES 2 334 528 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Proceso para generar diversidad *in vivo* con uso diagnóstico, terapéutico o vacunal.

## 5 Sector de la técnica

La invención se enmarca dentro del sector farmacéutico y está dirigida principalmente al desarrollo de vacunas humanas y veterinarias contra enfermedades causadas por agentes virales caracterizados por su elevada tasa de mutación y diversidad.

## 10 Estado de la técnica

Uno de los principales mecanismos de los virus para eludir el sistema inmunitario y adaptarse a distintos nichos es su capacidad de generar diversidad, tanto a nivel poblacional como en individuos infectados. Esta variabilidad se debe a la capacidad de recombinación y elevada tasa de mutación viral, siendo esta última mayor en aquellos virus que emplean una ARN polimerasa dependiente de ARN (RDRP) o una transcriptasa inversa durante su ciclo de replicación. Todo ello supone un obstáculo considerable en el diseño de vacunas eficaces. En el mejor de los casos, como ocurre con el virus de la gripe, implica variar anualmente la composición de la vacuna según sean las cepas circulantes. Sin embargo, para otros muchos virus como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) todavía no existe ninguna.

Para tratar de dar solución a este problema se han desarrollado distintas aproximaciones que podrían agruparse en cuatro grandes grupos. Una de ellas consiste en la búsqueda de epítomos ampliamente conservados [De Groot *et al.* Vaccine. 2005;23:2136-481. Otra estrategia es el empleo de secuencias consenso que permiten reducir la distancia efectiva entre cepas a la mitad [Gao *et al.* Expert Rev Vaccines. 2004;3:S161-81. Una tercera línea de acción se basa en la creación de antígenos que resultan de la mezcla combinatoria de péptidos o ADN partiendo de poblaciones diversas, de las que destacan principalmente los “antígenos revueltos” basados en la mezcla de epítomos solapables [Thomson *et al.* Vaccine. 2005;23:4647-57] y el “barajado de ADN” que emplea técnicas de evolución molecular dirigida [Locher *et al.* Expert Opin Biol Ther. 2004;4:589-97].

Una cuarta vía considera la inclusión simultánea de múltiples cepas o variantes de una secuencia. Su candidato más representativo probablemente sea PolyEnvl [Hurwitz *et al.* Curr Drug Targets Infect Disord. 2005;5:143-56] que contiene más de 50 envueltas diferentes del VIH y que ha demostrado respuestas inmunitarias más amplias y duraderas que las formulaciones que contenían sólo una. En este mismo sentido y para solventar el uso tan limitado de secuencias, se han propuesto otros candidatos capaces de generar diversidad *in vitro* y que aumentan en varios órdenes de magnitud la diversidad incluida en los mismos. De entre éstos sobresalen los “mixotopos” de un mismo epítopo [Grass-Masse *et al.* Pept Res. 1992;5:211-6], las “construcciones hipervariables de epítomos” que se sintetizan usando para cada posición concreta distintas proporciones de aminoácidos según su frecuencia en las bases de datos [Anderson *et al.* Vaccine. 1994;12:736-40] y de modo similar los “inmunógenos de múltiples epítomos” [Hewer *et al.*, J Theor Biol. 2005;233:85-90]. Así mismo, dado el gran número de variantes antigénicas que incluyen, estas aproximaciones abarcan también epítomos conformacionales (denominados mimotopos) y ofrecen un interés añadido para su uso en los ensayos diagnósticos [Hewer *et al.* Vaccine. 2005;23:2164-7]. Pese a todo, su síntesis resulta algo compleja y requieren de adyuvantes para desatar respuestas inmunes significativas en los modelos animales.

La producción de vacunas atenuadas o inactivadas conlleva la infección de huevos embrionarios, cultivos celulares o animales vivos, y consigo la generación de cierta variabilidad. Ésta, sin embargo, es puntual y se limita a cada ronda de infección, que suele provocar la lisis celular tras la cual se recogen los virus liberados. No obstante, hasta la fecha no se ha descrito ninguna estrategia capaz de generar diversidad de forma sostenida *in vivo*, y menos de forma limitada a la región de interés. Así, el uso de retrotransposones, de mutágenos o de vectores bacterianos con mutaciones en algún gen relacionado con su maquinaria de replicación permiten generar diversidad *in vivo*, pero afectan también al genoma del vehículo empleado, como sucede con la cepa de *Escherichia coli* XL-1 Red comercializada por Stratagene.

Otro problema clave es la necesidad de vacunas capaces de proteger en las mucosas. De este modo se controlaría el principal portal de entrada y reservorio de muchos patógenos, tal como ocurre con el tejido linfóide asociado al intestino (GALT), que comprende en tomo al 70% de las células del sistema inmunitario humano y queda gravemente infectado por el VIH durante las primeras semanas.

Existen distintas rutas para la inmunización de mucosas, como la nasal, oral, rectal, vaginal, transdérmica o respiratoria vía aerosol. La vía oral resulta particularmente atractiva por ser barata e ideal para campañas de vacunación masiva. Así mismo permite dirigir las células activadas al sistema respiratorio y genital [McDermott *et al.* J Immunol. 1979;122:1892-8] y a las glándulas salivares y mamarias [Holmgren *et al.* Nat Med. 2005;11:545-53] además de la mucosa intestinal, lo que facultaría su uso contra la transmisión sexual y en neonatos por amamantamiento.

El éxito para desatar una respuesta inmune por esta ruta depende principalmente de la elección de vectores apropiados, puesto que deben alcanzar la mucosa intestinal sin deteriorarse y poseer capacidad adyuvante intrínseca. Para ello, suelen usarse vectores virales o bacterianos que colonicen el tracto digestivo de forma natural, tales como poliovirus, rotavirus, *Salmonella spp.* o *Lactobacillus spp.* También el uso de levaduras [Stapanishcheva *et al.* Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol. 1959;30:38-43] y concretamente de *Saccharomyces cerevisiae* ha sido descrito previamente

[Duke *et al.* 1998. US Patent 5,830,463]. Las levaduras son fáciles de manipular, pueden producirse a gran escala de forma económica y someterse a procesos de liofilización para omitir la cadena de frío. Además soportan procesos que los vectores bacterianos no admiten y es posible la producción de glicoproteínas humanizadas [Wildt *et al.* Nat Rev Microbiol. 2005;3:119-28].

5

La mayoría de cepas de *S. cerevisiae* portan virus de ARN de doble cadena sin que éstos lisen ni disminuyan el crecimiento celular. Uno de los más comunes y mejor estudiados [Wickner. Microbiol Rev. 1996;60:250-65] es el virus citoplasmático L-A (también denominado L1 o ScV-L-A) del género Totivirus, que está presente en tomo a unas mil copias por célula y se transmite por citoducción a las células hijas. Este virus posee un ARN de unas 4,6 kilobases que codifica para una proteína mayor de la envuelta (Gag) y una polimerasa de ARN dependiente de ARN (RDRP) desfasada-1 base en la pauta de lectura, lo que asegura su incorporación en cada virión. El gen *pol* de la RDRP porta una secuencia de empaquetamiento y otra de unión a la RDRP. De ese modo, cada ARN (+) se encapsida, replica y transcribe dentro de la partícula viral donde las nuevas hebras (+) son secretadas al citoplasma y traducidas pese a no tener capuchón 5' ni cola poli-A en 3'. La incorporación *in vivo* [Fujimura *et al.* Cell. 1990;62:819-28] e *in vitro* [Ebihara *et al.* Biochem Biophys Res Commun. 1999;263:23-7] de transcritos heterólogos de ARN con el sitio de empaquetamiento dentro de los viriones ha sido descrita previamente, lo que posibilita el diseño de partículas similares a virus (VLPs) quiméricas.

El uso de VLPs se debe a la buena respuesta inmune que genera el organismo frente a antígenos de tamaño viral, así como a la demostración de inmunogenicidad tras su administración oral [Nicollier-Jamot *et al.* Vaccine. 2004;22:1079-86, Niikura *et al.* Virology. 2002;293:273-80, Tacket *et al.* Clin Immunol. 2003;108:241-7]. Su producción ha sido descrita desde células de insecto, a plantas o levaduras. Las de células de insecto se basan generalmente en el uso de baculovirus y están disponibles comercialmente. En el caso de levaduras, el modelo por excelencia es la vacuna contra la hepatitis B [Valenzuela *et al.* Nature. 1982;298:347-50], pero existen otros tipos descritos, como los basados en el retrotransposón Ty [Kingsman *et al.* Ann N Y Acad Sci. 1995;754:202-13] o virus y bacteriófagos heterólogos o quiméricos [Legendre *et al.* J Biotechnol. 2005;117:183-94, Janda *et al.* Cell. 1993;72:961-70, Price *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:9465-70, Lowe *et al.* J Infect Dis. 1997;176:1141-5, Zielonka *et al.* Virus Res. 2006;120:128-37, Xia *et al.* J Med Virol. 2007;79:74-83, Gedvilaite *et al.* Virology. 2000;273:21-35]. La pared celular de las levaduras impide la liberación de VLPs de forma espontánea, por lo que según la necesidad es necesario lisar la célula o preparar esferoplastos [Sakuragi *et al.* Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99:7956-61].

Las levaduras también permiten la expresión de proteínas heterólogas en su superficie a través de la unión a componentes de su pared celular. Esto ofrece multitud de aplicaciones biotecnológicas, abarcando desde biocatalizadores inmovilizados a biosensores o vacunas. Las proteínas de anclaje más usadas son la alfa-aglutinina [Schreuder *et al.* Trends Biotechnol. 1996;14:115-20, Tamaru *et al.* Biotechnol Prog. 2006;22:949-53, Ueda *et al.* J Biosci Bioeng. 2000;90:125-36] y a-aglutinina [Wittrup *et al.* 2004. US Patent 6,699,658] si bien existen otras que también pueden servir, como la floculina, Cwp1p, Cwp2p o Tip1p. Los receptores celulares a- y alfa-aglutinina median en la adhesión de células haploides a y alfa para la formación de diploides. La alfa-aglutinina consiste en una unidad covalentemente unida a los glucanos de la pared a través de su extremo C-terminal. Por el contrario, la a-aglutinina consiste en dos subunidades, Aga1p y Aga2p. Aga1p es secretada fuera y se une covalentemente al beta-glucano de la matriz extracelular, mientras que Aga2p se une a Aga1p mediante dos puentes disulfuro.

La presente invención aporta al estado de la técnica un método para generar diversidad *in vivo* de forma sostenida y limitada a la región de interés, dejando estable el resto del genoma del vehículo. Para ello, el autor propone el uso de levaduras que contienen VLPs diseñadas para empaquetar y replicar la región de interés y mostrarla en la superficie celular si se desea.

### Descripción detallada de la invención

Es objeto de la presente invención desarrollar candidatos para su uso diagnóstico, terapéutico o vacunal, que permitan generar diversidad *in vivo* de forma sostenida en el tiempo y limitada al ARN que contiene la región de interés, dejando estable el resto del genoma del vehículo.

Los candidatos obtenidos por este procedimiento son particularmente beneficiosos contra patógenos con una considerable variación antigénica, tales como los virus que emplean una RDRP o una transcriptasa inversa durante su ciclo de replicación.

El vehículo empleado para generar diversidad *in vivo* es una levadura, preferiblemente *S. cerevisiae*, pero sin excluir cualquier otra.

60

La levadura de elección está diseñada para contener por una parte el o los ARN que codifican para la región de interés, y por otra todos los elementos requeridos para suministrar en *trans* las proteínas necesarias para la formación de VLPs que repliquen y empaqueten dicho ARN.

Adicionalmente, la levadura puede contener otros marcadores, genes o mutaciones que faciliten la expresión de la región de interés. Por ejemplo, los marcadores de selección *pep4* y *prb1* para minimizar la degradación del producto por proteasas, *kex2* para evitar la rotura de los productos que contengan la secuencia Lys-Arg, *ski2* para evitar represión en el número de copias del ARN que porta la región de interés, *mn9* para evitar hiperglicosilación, o patrones de

65

glicosilación humanizados. La levadura también puede contener receptores, ligandos u otros dominios heterólogos de unión a dianas de interés, tales como citoquinas, correceptores y otros ligandos del sistema inmunitario.

5 El ARN o los ARN comprenden la región de interés así como las secuencias para ser empaquetados y replicados por las VLPs. La región de interés puede contener cualquier secuencia de interés sobre la que se quiera obtener variabilidad. A modo de ejemplo, éstas pueden ser epítomos, antígenos, ARN interferentes, o combinaciones de éstos para el patógeno o patógenos de interés, preferiblemente virus.

10 Opcionalmente, el o los ARN pueden contener la secuencia de una proteína de anclaje a la pared celular de la levadura tales como Aga2p, alfa-aglutinina o floculina. De modo alternativo pueden incluir una secuencia señal para ser secretada al medio extracelular, dianas de corte de enzimas específicas, así como otras secuencias que codifiquen para adyuvantes, receptores, ligandos o dominios de unión a otras dianas de interés. Sirva de ejemplo la región básica de la proteína Tat para dirigir el producto de interés a los núcleos celulares. También pueden contener una o varias secuencias espaciadoras para evitar impedimentos estéricos, así como otros marcadores o epítomos a modo de control  
15 o para su purificación, tales como GFP o poli-His. Dado que la diversidad viral no ocurre totalmente al azar, si no que está condicionada por la propia viabilidad del virus así como por factores del sistema inmunitario, pueden incluirse igualmente en los ARN genes que resulten esenciales o tóxicos para la propia levadura.

20 El diseño de los ARN depende también del tipo de virus en que están basadas las VLPs. El uso simultáneo de varios ARN resulta de particular interés en las VLPs basadas en virus cuyo ARN es segmentado. Los ARN que no contienen ni capuchón ni cola poli A pueden ser sintetizados *in vitro* mediante transcripción por ARN polimerasas como la SP6, T7 o T3, e introducidos en la levadura por electroporación o cualquier otro método descrito en la literatura. Cuando sea necesario, se puede añadir el capuchón y/o la cola poli-A según los protocolos descritos en la literatura. Alternativamente, se puede introducir en la levadura el ADN que codifica para los ARN mediante las  
25 técnicas conocidas, ya sea usando vectores circularizados con o sin origen de replicación o fragmentos lineales de ADN. El ADN se podrá transcribir bajo promotores inducibles o constitutivos. Los vectores de ADN que no contengan origen de replicación o no se integren en el genoma se perderán con el tiempo, no así los ARN derivados de éstos que permanecerán sujetos a varibilidad en cada ciclo de replicación vírica.

30 Para obtener las proteínas de las VLPs que empaquetarán y replicarán los ARN antes descritos, las levaduras deben ser transformadas previamente con los vectores adecuados. Dichos vectores pueden ser circulares o lineales, estar integrados en el genoma o mantenerse episomalmente, y expresarse bajo cualquier promotor constitutivo o inducible conocido en el estado de la técnica. Los vectores codifican los elementos necesarios para empaquetar y replicar los ARN de interés. Estos elementos varían según el virus en que se basen las VLPs, y comprenden cualquier virus de  
35 ARN que use una RDRP en su ciclo celular, que son todos los virus de la clase III, IV y V de Baltimore.

Adicionalmente, las VLPs pueden portar los epítomos o antígenos heterólogos intercalados que sean de interés, así como RDRP modificadas en su especificidad o tasa de error. Los vectores también pueden codificar para los ARN en los casos descritos anteriormente.

40 Para evitar que las VLPs empaqueten sus propios ARN mensajeros, los vectores no contienen las regiones de empaquetamiento o las secuencias de éstas han sido sustituidas con mutaciones sinónimas para destruir las estructuras secundarias del ARN sin alterar el producto final codificado.

45 Las VLPs permiten proteger el ARN de interés en su interior y transmitirlo. La pared celular de la levadura impide de forma natural que las VLPs sean liberadas al exterior, transmitiéndose por tanto de células madre a hijas por citoducción.

50 Cada RDRP tiene una tasa de error de una base por cada diez mil a cien mil bases incorporadas. La diversidad se genera únicamente en el ARN de interés cada vez que es replicado por la RDRP, lo que permite generar poblaciones heterogéneas de la región de interés. Dicha diversidad ocurre al azar, siempre y cuando el producto no esté ligado a ninguna función tóxica o esencial para la célula, y es acumulable, sin embargo sólo se mantendrán y replicarán aquellas secuencias que mantengan suficiente homología en las regiones de replicación para ser replicadas y en las regiones de empaquetamiento para ser empaquetadas por las VLPs. De igual forma, sólo se mostrarán en la pared celular aquellos  
55 ARN de interés que estando diseñados para anclarse en la pared celular conserven suficiente homología en la proteína de anclaje.

60 La diversidad generada puede monitorizarse genotípicamente y fenotípicamente a lo largo del tiempo mediante métodos descritos en la literatura. Por citar algunos ejemplos, a nivel genotípico puede extraerse el ARN de las levaduras, pasarlo a ADN mediante transcripción inversa y amplificar la región de interés, para después clonarla en otro vehículo, preferiblemente *Escherichia coli*, y secuenciar un número estadísticamente significativo de la población. Dado que las secuencias de ARN para analizar presentan diversidad, es importante que no se pierdan en el proceso de transcripción inversa o amplificación. Para ello, es particularmente útil el uso de cebadores poli-dT para los ARN que contengan cola poli-A, de mezclas de cebadores al alar, o específicos con o sin ambigüedades, teniendo en cuenta  
65 que las regiones de replicación y empaquetamiento están más restringidas en su variabilidad y, por tanto, más conservadas. En casos particulares, puede incluirse el uso de sondas fluorescentes para verificar la presencia de mutaciones específicas que resulten de especial interés. Entre los métodos fenotípicos, se encuentran la separación de levaduras mediante FACS o partículas magnéticas, especialmente útiles cuando la región de interés se exprese en la superficie

celular, pero también las técnicas de hibridación *in situ*, inmunofluorescencia, Western-blot y ELISA, válidas también cuando el producto permanezca en el interior o sea secretado al exterior. Esto permite monitorizar la capacidad de unión a anticuerpos u otras moléculas. Resulta de particular interés evaluar y descartar, si procediera, la capacidad de unión a anticuerpos autoinmunes de la diversidad generada.

5 La invención puede ser usada como vacuna preventiva o terapéutica en humanos y animales, como levaduras enteras, lisadas o fracciones purificadas de éstas, incluyendo las VLPs y ARN, así como los productos secretados por éstas. Puede administrarse sola o en combinación con cualquier otro vehículo o vacuna, en cualquier dosis o formulación, incluyendo bebidas y productos alimenticios, ya sea como células viables o muertas, en solución o liofilizadas, 10 y por cualquier vía descrita, incluida la aplicación oral, tópica, inhalatoria, transdérmica, genital e inyectable. La inmunización con el candidato provoca una amplia respuesta inmune contra aquellas cepas divergentes del patógeno sobre el que está basado el candidato, y puede ser aplicado a un amplio rango de epítomos y antígenos de organismos patogénicos.

15 La invención también puede emplearse para el uso terapéutico, por ejemplo inmunizando a un animal con el candidato y obteniendo los anticuerpos generados o genes que codifican dichos anticuerpos para ser administrados después al sujeto humano. Otra aplicación terapéutica comprende la generación y uso de ARN interferentes, en el sentido y diseño más amplio posible, que contengan variabilidad.

20 La invención puede servir, además, para el inmunodiagnóstico de infecciones y medir la amplitud y grado de reactividad de una respuesta inmune.

Además, debido a que el nivel de diversidad generada es dependiente del número de ciclos de replicación, y por tanto del tiempo, puede controlarse el grado de diversidad global suministrada, lo que resulta de utilidad para el estudio 25 de otros problemas científicos básicos, como la correlación entre diversidad y agotamiento o relajación del sistema inmune, evolución, autoinmunidad, reactividad cruzada o el papel de los epítomos variables en la protección.

### Exposición de un modo de realización de la invención

30 Se ha diseñado un candidato aplicado a la región V3 de la envuelta de VIH y basado en el totivirus L-A para generar diversidad en *S. cerevisiae* y mostrarla en la pared celular de ésta.

#### 35 Descripción de la levadura

Se ha elegido la cepa MATa haploide de *S. cerevisiae* EBY100 comercializada por Invitrogen por su idoneidad para mostrar antígenos de interés en su superficie. Antes de transformar la célula se ha curado de los posibles virus L-A y M nativos mediante crecimiento a 39°C, posterior selección a 30°C y verificación mediante PCR. 40

#### Construcción de las VLPs

Se ha elegido el plásmido pI2L2 proporcionado por el Dr. Reed B. Wickner para suministrar en *trans* las proteínas 45 necesarias para las VLPs que empaquetarán los ARN heterólogos de interés. El plásmido codifica para L-A Gag y L-A RDRP, que se expresan bajo el promotor constitutivo *PGK1*. Dado que es replicado por la maquinaria celular permanece estable en el tiempo. Las señales de empaquetamiento viral se han destruido mediante mutaciones sinónimas para evitar que empaquete su propio ARN.

#### 50 Construcción de los ARN de interés

Se ha construido un vector basado en el plásmido pUC 18 que contiene los elementos necesarios para obtener el 55 ARN de interés y que se describe en detalle en la figura 1. Se ha usado como punto de partida la secuencia consenso de la región V3 del VIH descrita en la base de datos del Laboratorio Nacional de Los Alamos optimizada para el uso de codones en *S. cerevisiae*. El ARN se transcribe *in vitro* gracias al promotor SP6 y se electropora dentro de la levadura para que allí sea empaquetado y replicado por las VLPs.

Una vez están el plásmido pI2L2 y el ARN dentro de la levadura se pone en marcha el proceso que genera diversidad 60 *in vivo* y que se describe en detalle en la figura 2.

Las levaduras son clasificadas fenotípicamente gracias a la exhibición de los epítomos en la superficie celular mediante FACs o partículas magnéticas marcadas con los anticuerpos correspondientes. La diversidad generada es 65 monitorizada genotípicamente mediante secuenciación o hibridación con sondas específicas.

La inmunización con el candidato provoca una respuesta inmune amplia contra cepas divergentes del VIH.

**Descripción de las figuras**

## Figura 1

5 *Ejemplo de construcción para la obtención del ARN sujeto a diversidad*

La construcción está insertada en dianas del sitio de donación múltiple del plásmido pUC18 (11) y consiste en el promotor de la ARN polimerasa SP6 para la obtención de ARN (1), el extremo 5' del totivirus L-A para que sea replicado correctamente (2), la proteína de anclaje a la pared celular de *S. cerevisiae* Aga2p con su péptido señal para secretar la construcción (3) que está indicado con una línea a trazos, secuencia espaciadora de Gly-Ser para evitar impedimentos estéricos (4), los epítomos de control HA (5) y VSV-G (7) a ambos lados de la región de interés y separados de ésta por un breve espaciador, la secuencia que codifica para la región variable V3 de la envuelta del VIH (6), un par de codones de terminación de la traducción (8), el extremo 3' del totivirus L-A para que el ARN sea replicado y empaquetado correctamente (9) y la diana de restricción AviIII (10) para linearizar el plásmido y finalizar el ARN con la secuencia deseada. Una vez linearizado se obtiene el ARN sin capuchón 5' ni cola poli-A mediante síntesis *in vitro* con la polimerasa SP6. Este ARN se introduce después en la levadura mediante electroporación donde se expresa el producto de interés sujeto a diversidad tal como se aprecia en la figura 2.

## 20 Figura 2

*Ejemplo del proceso para generar diversidad in vivo*

La cepa EBY100 de *S. cerevisiae* (1) es transformada con el plásmido pI2L2 que codifica para L-A Gag y L-A RDRP (3). El plásmido pI2L2 está modificado con mutaciones sinónimas para destruir la estructura secundaria en la región de empaquetamiento del ARN sin afectar a la proteína y evitar que se incorpore a las VLPs. La proteína L-A Gag forma las VLPs (4). La RDRP (5) está desfasada en la pauta de lectura y se incorpora también en las VLPs fusionada a L-A Gag. El ARN descrito en la figura 1 y que contiene la región de interés V3 de VIH (2) es electroporado dentro de la célula y empaquetado dentro de las VLPs gracias a la RDRP que lo reconoce. Una vez dentro, el ARN es replicado (6). Las nuevas hebras (+) sintetizadas salen al citoplasma (7) donde son traducidas (8) y empaquetadas en otras VLPs. Cada ARN presenta nuevas mutaciones gracias a la tasa de error de la RDRP, lo que genera diversidad acumulable en cada ronda de replicación. El producto codificado se secreta al exterior (10) donde se une a la proteína de anclaje a la pared Aga1p (9) mediante dos puentes disulfuro gracias a Aga2p.

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Proceso para generar diversidad *in vivo* con uso diagnóstico, terapéutico o vacunal **caracterizado** por al menos tres componentes: (a) una cepa de levadura no patógena que ha sido previamente curada de posibles virus endógenos, (b) un ARN que incluye la región de interés sobre la cual se quiere generar diversidad, y (c) un vector que codifica para las VLPs y las RDRPs asociadas que empaquetarán y replicarán el ARN de interés en *trans*, y que comprende las siguientes etapas: (1) transformación de la levadura con el vector de expresión que codifica para las VLPs y las RDRPs asociadas, (2) expresión de las VLPs y las RDRPs asociadas, (3) transformación de la levadura con el ARN que incluye la región de interés así como las secuencias necesarias para ser empaquetado por las VLPs y replicado por las RDRPs. A partir de ahí el proceso ocurre por sí solo. (4) El ARN de interés es empaquetado por las VLPs y replicado por las RDRPs. (5) Las hebras recién sintetizadas contienen mutaciones al azar y son traducidas por la maquinaria celular en el citoplasma generándose una población cada vez más diversa formada por variantes del producto original. Dichas hebras (6) vuelven a ser empaquetadas y replicadas por otras VLPs, cerrando así el ciclo y generando más diversidad cada ronda de replicación del ARN de interés. Gracias a la pared celular de la levadura, las VLPs no tienen fase extracelular y se transmiten a las células hijas por citoducción sin usar la célula. (7) Por último se monitoriza la diversidad generada y selecciona si se desea los productos de interés antes de su uso final.
2. Proceso según reivindicación 1 donde la levadura empleada es preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Proceso según reivindicación 1 donde la levadura empleada contiene otros marcadores, genes, modificaciones, patrones de glicosilación y/o mutaciones que facilitan la expresión correcta del producto de interés.
4. Proceso según reivindicación 1 donde la levadura contiene otros receptores, ligandos o dominios heterólogos de unión a dianas de interés.
5. Proceso según reivindicación 1 donde la levadura contiene otros genes heterólogos de interés.
6. Proceso según reivindicación 1 donde las VLPs que empaquetan y replican el ARN sujeto a diversidad se basan en cualquier virus de ARN que use una RDRP en su ciclo celular.
7. Proceso según reivindicación 1 donde las VLPs que empaquetan y replican el ARN sujeto a diversidad se basan preferiblemente en el totivirus L-A.
8. Proceso según reivindicación 1 donde las VLPs que empaquetan y replican el ARN sujeto a diversidad están codificadas por uno o varios vectores circulares o lineales, que se mantienen episomalmente o integrados en el genoma de la levadura, y se expresan bajo cualquier promotor constitutivo o inducible conocido.
9. Proceso según reivindicación 1 donde las VLPs que empaquetan y replican el ARN sujeto a diversidad portan epítomos o antígenos heterólogos intercalados.
10. Proceso según reivindicación 1 donde la región de interés es cualquier secuencia de la que se quiera obtener diversidad, sea natural o artificial, incluyendo epítomos, antígenos, VLPs, ARN interferentes o combinaciones de éstos.
11. Proceso según reivindicación 1 donde el ADN que codifica para el ARN sujeto a diversidad y que comprende la región de interés es un vector lineal o circular, con o sin origen de replicación, bajo un promotor inducible o constitutivo, que se integra o no en el genoma de la levadura, que se mantiene episomalmente o se pierde con el tiempo, y es introducido en la levadura por cualquier método descrito.
12. Proceso según reivindicación 1 donde el ARN sujeto a diversidad y que comprende la región de interés es sintetizado *in vitro* mediante transcripción por ARN polimerasas e introducido en la levadura por electroporación o cualquier otro método descrito.
13. Proceso según reivindicación 1 donde el ARN sujeto a diversidad comprende la región de interés, así como las secuencias y características necesarias para ser replicado por una RDRP y empaquetado en VLPs.
14. Proceso según reivindicación 1 donde el ARN sujeto a diversidad y que comprende la región de interés es único o segmentado.
15. Proceso según reivindicación 1 donde el ARN sujeto a diversidad y que comprende la región de interés contiene una secuencia que codifica para una proteína de anclaje a la pared celular de la levadura.
16. Proceso según reivindicación 1 donde el ARN sujeto a diversidad y que comprende la región de interés contiene una secuencia señal para secretar el producto al medio extracelular.
17. Proceso según reivindicación 1 donde el ARN sujeto a diversidad y que comprende la región de interés contiene dianas de corte de enzimas específicas.

## ES 2 334 528 B1

18. Proceso según reivindicación 1 donde el ARN sujeto a diversidad y que comprende la región de interés contiene otras secuencias que codifican para adyuvantes, receptores, ligandos y/o dominios de unión a otras dianas de interés.

5 19. Proceso según reivindicación 1 donde el ARN sujeto a diversidad y que comprende la región de interés contiene una o varias secuencias espaciadoras.

20. Proceso según reivindicación 1 donde el ARN sujeto a diversidad y que comprende la región de interés contiene otros marcadores o epítomos para su purificación y/o de control.

10 21. Proceso según reivindicación 1 donde el ARN sujeto a diversidad y que comprende la región de interés contiene cambios en la pauta de lectura.

15 22. Proceso según reivindicación 1 donde el ARN sujeto a diversidad y que comprende la región de interés contiene genes esenciales o tóxicos para la levadura.

23. Proceso según reivindicación 1 donde la diversidad generada *in vivo* es acumulable en el tiempo.

20 24. Proceso según reivindicación 1 donde la diversidad generada *in vivo* se limita al ARN que codifica para la región de interés, manteniendo estable el resto del genoma de la levadura.

25 25. Proceso según reivindicación 1 donde la RDRP que replica el ARN de interés puede estar modificada en su especificidad o tasa de error.

26. Proceso según reivindicación 1 donde las secuencias de empaquetamiento de los vectores que codifican para las VLPs y las RDRPs asociadas han sido delecionadas o sustituidas con mutaciones sinónimas.

27. Proceso según reivindicación 1 donde la diversidad es monitorizada genotípicamente por cualquier método descrito.

30 28. Proceso según reivindicación 1 donde la diversidad es monitorizada fenotípicamente por cualquier método descrito.

35 29. Proceso según reivindicación 1 donde el candidato es la levadura entera, lisada o cualquier fracción de ésta purificada o secretada que contenga la diversidad generada.

30. Proceso según reivindicación 1 donde el candidato se usa como componente de un ensayo inmunodiagnóstico.

31. Proceso según reivindicación 1 donde el candidato se usa para terapia.

40 32. Proceso según reivindicación 1 donde el candidato se usa como vacuna.

33. Proceso según reivindicación 1 donde la inmunización con el candidato provoca una amplia respuesta inmune contra cepas divergentes del patógeno sobre el que está basado.

45 34. Proceso según reivindicación 1 donde el candidato se administra por cualquier ruta.

50

55

60

65



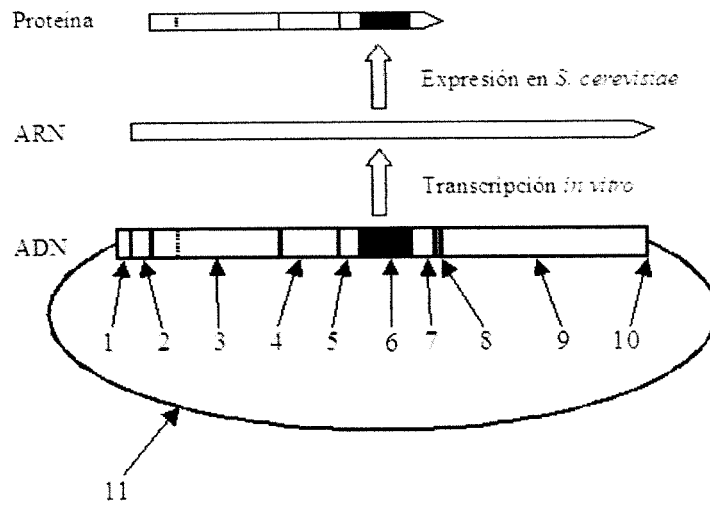


Figura 1.

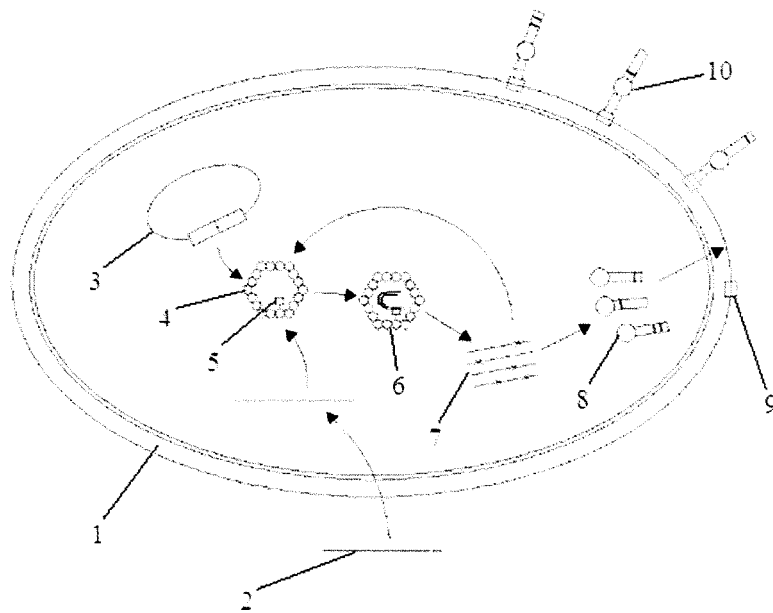


Figura 2.



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 334 528

② Nº de solicitud: 200700278

③ Fecha de presentación de la solicitud: 23.01.2007

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2004009193 A1 (MORIKAWA) 15.01.2004, párrafos [0004],[0008],[0012],[0013]-[0031],[0060]-[0077],[0085],[0095]; ejemplo 1.	1-34
A	REED B. WICKNER "Double - stranded RNA viruses of Saccharomyces cerevisiae" Microbiological reviews, mar. 1996. Vol 60, páginas 250-265; página 250, columna derecha; página 251, columna izquierda; página 252, columna derecha - página 253, columna derecha.	1-34
A	KELLY R. YOUNG et al. "Virus-like particles: designing an effective AIDS vaccine". Methods, 2006. Vol. 40, páginas 98-117; página 104, párrafo 2.2.1; página 106, párrafos 2.2.2 - página 108, párrafo 2.2.5.	1-34
A	US 5830463 A (DUKE et al.) 03.11.1998, reivindicaciones 1-9.	1-34
A	TSUTOMU FUJIMURA et al. "In vitro L-A double-stranded RNA synthesis in virus-like particles from Saccharomyces cerevisiae" Proc. Natl. Acad. Sci USA, junio 1986, vol. 83, páginas 4433-4437.	1-34

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

24.02.2010

Examinador

S. González Peñalba

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 15/81** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.02.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-34	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-34	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión:**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

**1. Documentos considerados:**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2004009193	15-01-2004
D02	Double-stranded RNA viruses	mar 1996
D03	Virus-like particles: designing	2006
D04	US 5830463	03-11-1998
D05	In vitro L-A double-stranded RNA synthesis	jun 1986

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de patente tal y como ha sido descrita hace referencia a un proceso para generar diversidad que comprende las etapas de: 1) transformar una levadura (EBY 100 de *Saccharomyces cerevisiae*) con un vector de expresión (pI2L2, totivirus LA) que codifica para las VLPs y las RDRPs, 2) expresión de las VLPs y las RDRPs asociadas, y 3) transformar la levadura con el ARN que incluye la región de interés, así como las secuencias necesarias para ser empaquetado por las VLPs y replicado por las RDRPs, 4) el ARN de interés es empaquetado por las VLPs y replicado por las RDRPs, 5) las hebras recién sintetizadas contienen mutaciones al azar y son traducidas por la máquina celular en el citoplasma generándose una población cada vez más diversa formada por variantes del producto original y 6) dichas hebras vuelven a ser empaquetadas y replicadas por otras VLPs.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA. LP. ARTs 6 y 8

El documento D01 se refiere a un procedimiento para sintetizar VLPs que tienen una proteína de un virus y una membrana de doble capa lipídica derivada de un microorganismo eucariótico (levadura), el procedimiento comprende (párrafos [0013]-[0031]): a) incorporar un gen que codifica para una proteína esencial para la formación de la partícula viral, o un fragmento suyo, en un vector que puede ser expresado en microorganismos eucarióticos, b) transfectar el vector en un microorganismo eucariótico, c) cultivar el microorganismo eucariótico transfectado, e) eliminar la pared celular del microorganismo eucariótico y f) cultivar y obtener el sobrenadante del cultivo. Se puede utilizar como microorganismo eucariótico *Saccharomyces cerevisiae* (Ejemplo 1). Como vector en el que se inserta el fragmento de cDNA que codifica para la proteína Gag de HIV, el pKT10 del tipo YE<sub>p</sub> (Ejemplo 1). Y como cepa en la que se introduce dicho vector la cepa MATa de *Saccharomyces cerevisiae* RAY 3A-D (Ejemplo 1). En dicho procedimiento se consigue la obtención de VLPs en un corto período de tiempo, párrafo [0012]. Las composiciones obtenidas pueden ser utilizadas como vacunas (reivindicaciones 10-13).

El documento D02 describe que la mayoría de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tienen virus de ARN de doble cadena, que se replican de manera estable en las células sin lisarlas, ni afectar a su crecimiento (página 250, columna derecha). Uno de estos virus es el virus L-A del grupo totivirus que tiene un ARN de 4.8 kilobases y codifica para una proteína de la envuelta llamada Gag (página 251, columna izquierda) y para una polimerasa de ARN dependiente de ARN (RDRP) (página 252, columna derecha - página 253, columna derecha). Cada RNA se encapsida, replica y transcribe dentro de la proteína viral, gracias al gen pol de la RDRP que tiene una secuencia de empaquetamiento y otra de unión a la RDRP, las nuevas hebras son secretadas al citoplasma y traducidas.

El documento D03 trata de VLP como alternativa para la creación de vacunas de una gran variedad de virus y más concretamente del virus HIV. Para lentivirus, las VLPs deben contener Gag (HIV). Cada partícula está envuelta en una bicapa lipídica procedente de la célula huésped. El polipéptido precursor de Gag o Gag-pol es procesado proteolíticamente por la proteasa viral. La expresión de los productos del gen Gag es suficiente para formar una partícula, y por lo tanto todas las vacunas AIDS que expresan el gen Gag in vivo forman partículas (página 104, párrafos 2.2.1). el documento también hace referencia a que las VLPs de lentivirus provocan tanto respuesta inmune como a nivel de mucosa tras la administración como partículas purificadas o expresadas in vivo a partir de plásmidos de DNA o vectores virales (página 106, párrafos 2.2.2 - página 108, párrafo 2.2.5).

Hoja adicional

El documento D04 describe vehículos de levaduras que se pueden utilizar para expresión de genes, liberación de fármacos y su utilización desde el punto de vista inmunológico. El método consiste en administrar a un mamífero una levadura (entre las que se encuentra cepas de *Saccharomyces cerevisiae*) que ha sido transformada con una molécula de ácido nucleico que codifica para un antígeno, y dicho antígeno ha sido expresado por dicha levadura. El antígeno puede ser entre otros antígenos virales (reivindicaciones 1-9).

El documento D05 se refiere a que la mayoría de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* contienen VLPs que contienen RNA de doble cadena, y demuestran in vitro la síntesis de L-A ds RNA.

Por lo tanto, ninguno de los documentos citados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-34. Además, en los documentos citados no existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en dichas reivindicaciones. Por consiguiente, el objeto de las reivindicaciones 1-34 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con la LP, arts 6 y 8.