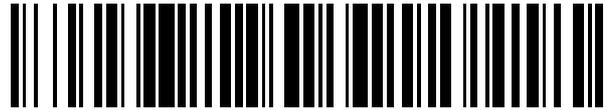


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 546**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/29** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02760072 .5**

96 Fecha de presentación: **12.07.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1417973**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2004**

54 Título: **Formulación de vacuna potenciada mediante la combinación de un ADN con un antígeno**

30 Prioridad:

**16.07.2001 CU 17101**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**26.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**26.12.2012**

73 Titular/es:

**CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y  
BIOTECNOLOGÍA (CIGB) (100.0%)  
AVENIDA, 31 ENTRE 158 Y 190  
CUBANACAN PLAYA  
CIUDAD DE LA HABANA 10600, CU**

72 Inventor/es:

**DUEÑAS CARRERA, SANTIAGO;  
MORALES GRILLO, JUAN;  
ALVAREZ-LAJONCHERE PONCE DE LEON, LIZ;  
MUSACCHIO LASA, ALEXIS;  
PAJON FEYT, ROLANDO;  
VINA RODRÍGUEZ, ARIEL;  
ÁLVAREZ OBREGÓN, JULIO C.;  
ACOSTA RIVERO, NELSON y  
MARTINEZ DONATO, GILLIAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 393 546 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

Formulación de vacuna potenciada mediante la combinación de un ADN con un antígeno

**Campo de la invención**

5 La presente invención está relacionada con la rama de la medicina, particularmente con una nueva formulación de antígenos de vacuna. El objetivo técnico de la presente invención es el desarrollo de nuevas formulaciones de vacunas, minimizando el número de componentes que son capaces de inducir una respuesta inmune potenciada y diversa mediante la interacción entre ellas. Adicionalmente, se enfoca el desarrollo de formulaciones de vacunas combinadas a fin de aumentar la respuesta inmune inducida frente a antígenos administrados simultáneamente.

**Técnica anterior**

10 Existen algunos obstáculos para la obtención de una vacuna eficaz contra el VHC. Como se trata de un virus de ARN, el VHC puede mutar rápidamente en adaptación al entorno. Esto contribuye a la elevada diversidad de secuencias de los múltiples aislados víricos identificados en el mundo. La mayor heterogeneidad se concentra sobre la región hipervariable I de la proteína E2 del VHC, en la que se ha descrito un posible epítipo neutralizante. El VHC produce una infección persistente a pesar de la existencia de una respuesta inmune activa (Lechmann y col., Semin Liver Dis 2000, 20, 211-226). No existe ningún modelo animal, ni un sistema de cultivo in vitro para la replicación eficaz del virus y el estudio sobre la aparición de anticuerpos neutralizantes. No se han definido modelos inmunológicos asociados con la progresión o con la protección de la enfermedad. Es probable que se requieran respuestas inmunes humorales y celulares potentes, multiespecíficas y de larga duración para la resolución de la infección (Lechmann y col., Semin Liver Dis 2000, 20, 211-226).

20 Se han utilizado algunos enfoques para desarrollar una vacuna contra el VHC. Proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, partículas de tipo virus, vacunas de ADN, y vectores víricos vivos son las más ampliamente evaluadas.

25 El desarrollo de una vacuna basada en subunidades de proteínas fue una de las primeras estrategias evaluadas para el VHC debido a que diversos anticuerpos de flavivirus dirigidos contra las proteínas superficiales pueden conferir protección. Algunas variantes basadas en los antígenos estructurales del VHC han conseguido protección limitada contra el virus en modelos animales. Tal es el caso de los chimpancés inmunizados con heterodímeros E1-E2. Se vacunaron siete chimpancés, cinco quedaron protegidos y dos desarrollaron una enfermedad autolimitante (Choo y col., PROC NATL ACAD SCI USES 1994, 91, 1294-1298). Esta protección se ha correlacionado con la presencia de anticuerpos (Abs) capaces de inhibir la unión de E2 con células humanas (Rosa y col., PROC NATL ACAD SCI USES 1996, 93, 1759-1763).

30 La proteína E1 recombinante procedente de un aislado del genotipo 1 b se purificó como homodímeros autoasociativos en partículas de 9 nm de diámetro, aproximadamente (Maertens y col., Records Gastroenterol Belg 2000, 63, 203). Dos chimpancés crónicamente infectados con VHC recibieron 9 dosis de 50 µg de la proteína E1 recombinante. La vacunación mejoró la histología hepática y determinó la desaparición de los antígenos víricos del hígado. La vacunación con la proteína E1 recombinante redujo también los niveles de alanina aminotransferasa (ALT). Aunque los niveles de ARN vírico en el suero no cambian durante el tratamiento, la inflamación del hígado y los niveles de antígenos víricos aumentaron tras el tratamiento. Se observó una asociación entre los niveles elevados de anticuerpos frente a E1 y la mejora de la enfermedad (Maertens y col., Records Gastroenterol Belg 2000, 63, 203).

40 Particularmente, la formación de partículas de tipo virus a partir de proteínas recombinantes y su empleo como vacunas es muy atractiva debido a que estas estructuras simulan con frecuencia propiedades víricas. Este tipo de partículas, obtenidas de células de insectos infectadas con baculovirus recombinantes que contienen la secuencia de los antígenos estructurales del VHC, ha sido capaz de generar una respuesta inmune humoral y celular frente a estos antígenos (Baumert y col., Gastroenterology 1999, 117, 1397-407; Lechmann y col., Hepatology 1999, 30, 423-429). Aunque los resultados obtenidos con vacunas basadas en subunidades de proteínas son alentadores, la respuesta inmune inducida por estas variantes es principalmente humoral, de corto plazo y específica del aislado.

45 Por otra parte, se han evaluado diferentes vectores víricos recombinantes en el desarrollo de una vacuna recombinante contra el VHC. Particularmente, los vectores adenovíricos recombinantes son candidatos interesantes debido a su tropismo hepático, su poder para inducir la inmunidad humoral y celular, y su factibilidad para la administración oral o sistémica. Los adenovirus que contienen la secuencia que codifica el ADN de las proteínas estructurales del VHC inducen una respuesta de anticuerpos contra cada una de estas proteínas (Makimura y col., Vaccine 1996, 14, 28-36). Además, tras la inmunización en ratones con adenovirus recombinantes para C y E1, se detectó una respuesta específica de LTC contra estos antígenos (Bruna-Romero y col., Hepatology 1997, 25, 470-477). Aunque estos resultados han sido alentadores, los recientes problemas con el uso de adenovirus recombinantes en la terapia génica han hecho aumentar las dudas acerca de su empleo en seres humanos. Otros virus recombinantes, de tipo vaccinia, viruela del canario y viruela aviar, que contienen diferentes genes de VHC, han inducido fuertes respuestas inmunes de LTC y linfocitos T auxiliares en ratones (Shirai y col., J Virol 1994, 68, 3334-3342; Large y col., J Immunol 1999, 162, 931-938). Sin embargo, estos virus recombinantes, así como el resto de variantes de los alfavirus del tipo del Virus del Bosque Semliki también se ven afectados por problemas de la

normativa y los modelos de seguridad relacionados con su aplicación.

La identificación de algunos epítomos en los linfocitos T CD4+ y CD8+ de la poliproteína del VHC que podrían ser importantes en la eliminación vírica, apoya la evaluación de los péptidos sintéticos como candidatos de vacunas frente a este patógeno. Diferentes péptidos, lipidados o no, que contienen los epítomos de C, NS4 y NS5, han inducido una fuerte respuesta de LTC en ratones (Shirai y col., J Infect Dis 1996, 173, 24-31; Hiranuma y col., J Gene Virol 1999, 80, 187-193; Oseroff y col., Vaccine 1998, 16, 823-833).

Otra estrategia utilizada para desarrollar una vacuna contra el VHC se basa en la posibilidad de generar Abs frente a epítomos lineales. Se ha evaluado básicamente esta alternativa para generar Abs contra la región HVR-I del VHC, con algunos resultados alentadores en conejos y chimpancés (Esumi y col., Arch Virol 1999, 144, 973-980; Shang y col., Virology 1999, 258, 396-405). Las cuasiespecies son el principal problema de seleccionar la región HVR-I como diana para una vacuna contra el VHC.

El principal obstáculo para las vacunas peptídicas es que aquellos péptidos sin epítomos para los linfocitos T auxiliares pueden ser malos inmunógenos. Además, la eficacia de una vacuna se basa frecuentemente en la inducción de una respuesta inmune específica frente a una amplia variedad de diferentes antígenos. Estas limitaciones son una importante debilidad de esta estrategia.

La inmunización con ADN es una de las estrategias más recientes en el desarrollo de vacunas. Una vacuna de ADN consiste en un plásmido purificado que contiene la secuencia de codificación de un antígeno de interés, bajo el control de una unidad transcripcional funcional en células eucariotas. Tras la inyección del plásmido en el músculo o la piel, las células hospedadoras capturan el plásmido y el antígeno se expresa intracelularmente. La expresión de los antígenos codificados en las células hospedadoras es una de las principales ventajas de esta metodología debido a que es similar a las infecciones víricas naturales. La simplicidad para manipular el ADN, junto con la estabilidad del ADN que hace posible una producción a gran escala relativamente barata del ADN, es otra ventaja de la vacunación con ADN.

La respuesta inmune inducida con este tipo de vacunas se puede modular con moléculas o genes que codifican moléculas coestimuladoras del tipo de las citoquinas. Las construcciones genéticas se pueden modificar, mediante inserciones o deleciones de dominios transmembrana, secuencias señal para la secreción, y otros tipos de restos que afectan el tráfico y el procesamiento intracelular del antígeno.

Particularmente, se ha estudiado ampliamente la inmunización con ADN en el desarrollo de vacunas contra el VHC. Se han generado diferentes vectores de expresión que codifican variantes de longitud completa o truncadas de la proteína de la cápsida del VHC (Lagging y col., J Virol 1995, 69, 5859-5863; Chen y col., Vaccine Res 1995, 4, 135-144). Otras construcciones incluyen también la región 5' no traducida del VHC (Tokushige y col., Hepatology 1996, 24, 14-20). Se han evaluado plásmidos que expresan variantes de fusión para el antígeno superficial del virus de la hepatitis B (VHB) u otros antígenos de la envuelta del VHB (Major y col., J VIROL 1995, 69, 5798-5805). La inmunización con estos plásmidos ha inducido generalmente una respuesta proliferativa de los LTC y los linfocitos.

Las proteínas de la envuelta del VHC han constituido dianas de interés para este tipo de tecnología. En el caso de la proteína E2 del VHC, la respuesta humoral parece dirigirse principalmente a la región HVR-1 (Lee y col., Mol Cells 1998, 8, 444-451). La inmunización con plásmidos que expresan las variantes intracelulares o secretadas de las proteínas E1 y E2 se ha convertido en una respuesta inmune similar (Lee y col., J VIROL 1998, 72, 8430-8436). La inoculación con plásmidos bicistrónicos que expresan GM-CSF y las proteínas E1 o E2 del VHC aumentó la respuesta inmune humoral y celular. Recientemente, se generó el uso de plásmidos bicistrónicos que expresaban las proteínas E1 y E2 para investigar la influencia de la formación del heterodímero entre estas proteínas *in vivo* sobre la respuesta inmune inducida tras la inmunización con ADN. Cuando se formaron los heterodímeros, no se obtuvo respuesta de anticuerpos frente a las proteínas E1 y E2 del VHC. En marcado contraste, se obtuvo un alto nivel de títulos de anticuerpo, dirigidos a epítomos lineales y conformacionales, tras la inmunización con plásmidos que expresaban variantes truncadas de E1 y E2. Por tanto, parece necesario evitar la formación de heterodímeros para obtener una fuerte respuesta de anticuerpos cuando se evalúan las construcciones que incluyen estos antígenos (Foumillier y col., J VIROL 1999, 73, 497-504).

Se han evaluado también proteínas no estructurales mediante esta tecnología. Se obtuvieron buenos resultados cuando la región que codificaba el dominio del extremo C de la proteína NS3 se incluyó en un vector que permitía la expresión simultánea e independiente de este dominio y la IL-2 (Papa y col., Res Virol 1998, 149, 315-319). Las proteínas NS4 y NS5 generan también respuestas de Abs y LTC mediante esta estrategia de inmunización (Encke y col., J IMMUNOL 1998, 161, 4917-4923). Recientemente, el uso de una construcción que codifica GM-CSF y las proteínas no estructurales del virión (NS3, NS4 y NS5) indujeron una potente respuesta de Ab y una potencial respuesta linfoproliferativa frente a cada proteína no estructural (Cho y col., Vaccine 1999, 17, 1136-1144).

En general, se ha notificado la expresión eficaz de diferentes antígenos del VHC, así como la generación de Abs dirigidos contra el VHC en niveles que varían desde 1:100 a 1:100 000 de acuerdo con la combinación en el estudio para diferentes construcciones de ADN (Inchauspe y col., Vaccine 1997, 15, 853-856). Adicionalmente, se ha demostrado el desarrollo de una respuesta proliferativa de LTC específicos y linfocitos (Inchauspe y col., DNA AND

CELL BIOLOGY 1997, 16, 185-195). Sin embargo, se requieren esfuerzos para mejorar esta metodología con el fin de generar una respuesta humoral y celular más fuerte frente a diferentes proteínas del VHC. De esta manera, se han evaluado algunas variantes tipo liposomas (Gramzinski y col., Mol Medicine 1998, 4, 109-118) y saponina QS-21 (Sasaki y col., J Virol 1998, 72, 4931-4939) para aumentar la respuesta inmune inducida tras la vacunación con ADN. Se han estudiado también las células dendríticas como adyuvantes biológicos en la inmunización con ADN. Las células dendríticas (CD) derivadas de la médula ósea de ratón antecesor genéticamente modificado que expresan antígenos tumorales, utilizando vectores víricos (Specht y col., J Exp Med 1997, 186, 1213-1221; Brossart y col., J Immunol 1997, 158, 3270-3276; Song y col., J Exp Med 1997, 186, 1247-1256), o ARN (Boczkowski y col., J Exp Med 1996, 184, 465-472), han demostrado su capacidad para promover una respuesta de los linfocitos T específica de antígenos tumorales, y una inmunidad profiláctica mediada por células frente a tumores en ratón.

Hasta el momento, la mejora de vectores para la inmunización con ADN, que incluye la inserción de motivos CpG para aumentar la respuesta inmune frente a los antígenos expresados (Hasan y col., J Immunol Meth 1999, 229, 1-22), y los sistemas de administración de ADN es crucial para superar las limitaciones de esta tecnología. Debido a los desafíos que plantea la infección por el VHC, y a la ausencia de una definición clara de los parámetros inmunológicos correlacionados con la protección frente a este patógeno, es posible que una vacuna eficaz frente al VHC requiera una solución multiespecífica que estimule varios aspectos de la respuesta inmune. La solución de este problema está probablemente en la combinación de diversas estrategias de vacunación exploradas hasta el momento. Particularmente, se han evaluado programas de inmunización que combinan una dosis primaria con una vacuna de ADN y una dosis de refuerzo con proteínas recombinantes o vectores víricos (Hu y col., Vaccine 1999, 17, 3160-3170; Pancholi y col., J Infect Dis 2000, 182, 18-27) con resultados que, aunque positivos, requieren investigaciones adicionales para demostrar si las estrategias de refuerzo primarias pueden realmente inducir una inmunidad protectora frente al VHC.

Adicionalmente, para el modelo de la hepatitis B, se ha evaluado una composición de vacuna que comprende el complejo formado por el antígeno superficial de la hepatitis B, un anticuerpo específico de este antígeno, y una vacuna de ADN que expresa este antígeno (Wen y col., documento US6221664, 1998). Esta formulación permitió la presentación del antígeno por medios diferentes y una rápida inducción de la respuesta inmune que resultó superior con respecto a una generada por las variantes individuales.

El documento EP 0913157 da a conocer un complejo de vacuna que comprende un antígeno, al anticuerpo correspondiente y un plásmido recombinante que contiene los ADN que codifican el antígeno y su uso en terapia.

Gürsel y col (1999) Vaccine 17:1376-1383 dan a conocer que el ADN del plásmido en liposomas puede actuar como un inmunoadyuvante.

En la presente divulgación, se describe una formulación de vacuna que comprende como componentes únicamente un antígeno de proteína y un plásmido que expresa una o varias proteínas, actuando al menos uno de ellos como adyuvante el otro. Particularmente, se evalúan el antígeno de la cápsida del virus de la hepatitis C o B, y un plásmido que expresa variantes individuales o de poliproteínas de la proteína E1 del VHC. Al contrario que la composición anteriormente descrita para el modelo de la hepatitis B, no se requiere la presencia de anticuerpos en la formulación para generar la potenciación de la respuesta inmune, reduciéndose de esta manera el número de componentes requeridos. Adicionalmente, la mayor flexibilidad de la composición de vacuna permite también generar simultáneamente potentes respuestas inmunes frente a diferentes antígenos.

#### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se define por las reivindicaciones y proporciona formulaciones y procedimientos para inmunizar un individuo de una manera profiláctica o terapéutica frente al VHC y el VHB, así como su combinación. Se ha notificado por primera vez una formulación de vacuna que tiene como componentes: (a) un ADN que expresa una variante de proteína que incluye regiones del antígeno de E1 de la envuelta del VHC y (b) un antígeno de proteína del VHC o VHB, en proporciones adecuadas. La novedad de la invención viene dada por el efecto adyuvante de al menos un componente sobre la respuesta inmune generada frente al otro. Los antígenos codificados por las construcciones genéticas y expresados por las células hospedadoras, así como el antígeno de la proteína que comprende la vacuna de la formulación, son dianas de interés para generar una respuesta inmune frente al VHC y al VHB.

La formulación de vacuna incluye un ADN que potencia la respuesta inmune generada frente a un antígeno de la proteína mezclado con el mismo; siendo este efecto dependiente de la expresión de una o varias proteínas codificadas por el ADN, en el hospedador inmunizado. El ADN se obtiene de una cepa bacteriana y se purifica de acuerdo con los procedimientos tradicionales (Horn y col., H Gene Ther 1995, 6, 565-573).

*La formulación de vacuna comprende en las realizaciones preferidas al menos uno de los siguientes plásmidos: pIDKE1S, pIDKE2 y pAEC-ME, cuyas secuencias de ADN que codifican las variantes de proteínas se identifican con el número de secuencia de 2-4, respectivamente.*

*El plásmido pIDKE1S expresó una proteína que comprendía los aa desde el 176 al 363 de la proteína E1 del VHC (Sec. Id. Nº 2). Por otra parte, el plásmido pIDKE2 expresó una proteína que abarcaba los primeros 650 aa de la*

5 *poliproteína vírica (C, E1 y una parte de la E2) (Sec. Id. N° 3). El plásmido pAEC-ME expresa una proteína quimérica que comprende los epítomos de los linfocitos B y T de diferentes antígenos del VHC (Sec. Id. N° 4). En estos plásmidos, la secuencia de codificación de los antígenos víricos se obtuvo a partir del ADNc de un aislado cubano del VHC (Morales y col., 1998, documento WO 98/25960). Los plásmidos pAEC-ME, pIDKE1S y pIDKE2 contienen la secuencia de codificación de los antígenos del VHC insertados en el sitio de múltiple clonación del plásmido pAEC-K6 (Herrera y col., Biochem Biophys Res Commun. 2000, 279, 548-551). Los plásmidos incluidos en la presente invención tienen los elementos reguladores capaces de dirigir la expresión del antígeno en células humanas. Estos elementos reguladores incluyen una unidad transcripcional funcional en mamíferos, integrada por ejemplo por el promotor del citomegalovirus humano y la señal de poliadenilación del virus 40 de simios. Estos plásmidos contienen también un origen de replicación en bacterias y un marcador de selección para la resistencia a la kanamicina.*

10 El componente de proteína de la formulación puede ser un antígeno vírico soluble capaz de formar partículas, con una pureza superior al 90%. En las realizaciones preferidas, son componentes de la formulación de vacuna los antígenos de las cápsidas del VHC y el VHB, que potenciaron la respuesta inmune generada frente a las proteínas expresadas por el ADN mezclado con ellos.

15 La presente divulgación contempla también el procedimiento para la mezcla del ADN con el antígeno. La mezcla se prepara mediante la adición de componentes, el ADN y el antígeno, disueltos en un tampón adecuado. En realizaciones preferidas, la formulación se puede preparar mediante la combinación de ambos componentes, disueltos en solución salina tamponada con fosfato, en una proporción 10/1 (p/p). La mezcla se incubó al menos 2 h entre 26° C y 30° C, con agitación, antes de la administración a los individuos. Esta formulación se puede administrar por vía intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intramucosal, intravenosa, sublingual, u otras. La inmunización se puede llevar a cabo por medio de jeringuillas, pistola de genes, pulverizadores u otros dispositivos de administración. Cada individuo recibe una dosis que varía de 0,001 a 10 mg de cada componente en un volumen determinado por la especie animal y el procedimiento de inmunización empleados.

20 En el caso de las formulaciones de vacuna que tienen como componentes un ADN mezclado con un antígeno de proteína, se puede obtener un producto superior en comparación con cada uno de los componentes individuales debido a que:

- Es posible generar una respuesta inmune humoral y celular más fuerte y diversa dirigida a un intervalo más amplio de epítomos.
- Se puede eliminar el efecto tóxico generado por la inyección del adyuvante debido a que el antígeno 2 es simultáneamente el adyuvante.
- Es posible el empleo de estas formulaciones como núcleo de vacunas combinadas.

El procedimiento de formulación de la vacuna no requiere la adsorción del antígeno.

35 En el caso de las formulaciones que contienen un ADN que expresa una variante de proteína que incluye regiones de la proteína E1 del VHC, y de la proteína de la cápsida del VHC, se puede obtener un producto superior en comparación con cada uno de los componentes individuales debido a que:

- Es posible generar una respuesta inmune humoral y celular más fuerte y diversa dirigida a un intervalo más amplio de epítomos.
- Se puede eliminar el efecto tóxico generado por la inyección del adyuvante debido a que el antígeno 2 es simultáneamente el adyuvante.
- Es posible el empleo del ADN más la cápsida como núcleo de vacunas combinadas o multivalentes.

40 Por otra parte, la inmunización con un ADN que expresa una variante de proteína que incluye regiones de la proteína E1 del VHC aumentó la inmunogenicidad de los antígenos de la proteína VHB, presentes en la formulación. Particularmente, la mezcla con el HbsAg o el HBcAg, permite superiores resultados a los obtenidos con estos antígenos debido a que:

- a) Los niveles de IgG inducidos contra a HbsAg son superiores a los obtenidos con la inoculación del HbsAg con hidróxido de aluminio.
- b) Constituye una vacuna combinada del VHB-VHC potencial.
- c) El procedimiento de formulación no requiere la adsorción del antígeno.

## 50 **Descripción de las figuras**

**Figura 1;** Representación esquemática de los plásmidos pAEC-ME, pIDKE1S y pIDKE2.

**Figura 2:** Fotografía realizada con el microscopio de electrones de las partículas de la cápsida del virus de la hepatitis C **(A)**, del antígeno superficial del virus de la hepatitis B **(B)** y de la cápsida del virus de la hepatitis B **(C)**

55 **Figura 3:** Programa de inmunización con el plásmido pIDKE2 y la proteína del núcleo. Los animales se inmunizaron por vía intramuscular con 50 µg de ADN y 5 µg de proteína.

**Figura 4:** Programa de inmunización con diferentes plásmidos y la proteína HBcAg. Los animales se

inmunizaron por vía intramuscular con 50 µg de ADN y 5 µg de proteína.

**Figura 5:** Programa de inmunización con diferentes plásmidos y la proteína HbsAg; los animales se inmunizaron por vía intramuscular con 50 µg de ADN y 5 µg de proteína.

### Ejemplos

#### 5 **Ejemplo 1: Inmunogenicidad de formulaciones que tienen como componentes un ADN que expresa una poliproteína de la Cápsida-E1-E2 del VHC, y el antígeno de la proteína de la cápsida del VHC.**

Con el objetivo de demostrar la potenciación de la respuesta inmune generada frente a los antígenos estructurales del VHC tras la administración de la mezcla del plásmido pIDKE2 (Figura 1), con partículas de la cápsida del VHC recombinante (Figura 2A), 10 ratones BALB/c hembras, de 8 semanas de edad, por grupo, se inocularon por vía intramuscular. El programa incluyó 2 inoculaciones en los días 0 y 21, excepto uno de los grupos en el que se estudió la influencia de una única dosis en el día 0. Se extrajeron muestras de sangre 14 semanas después de la primera inmunización. Se administraron los inmunógenos en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se inoculó el grupo 1 con 50 µg del plásmido pIDKE2 (Figura 1, el plásmido contiene la secuencia de codificación de los primeros 650 aa de la poliproteína vírica, Sec. Id N° 3). Se inoculó el grupo 2 con 5 µg de la proteína nuclear (que comprende los primeros 173 aa de la proteína de la cápsida del VHC). El grupo 3 recibió una primera dosis con 5 µg de la proteína nuclear y una segunda con 50 µg del pIDKE2 (Nuclear/pIDKE2). El grupo 4 se inoculó en condiciones similares que el grupo 3 pero en orden inverso (pIDKE2/Nuclear). El grupo 5 se inoculó con la mezcla de 50 µg del pIDKE2 y 5 µg de la proteína nuclear en los días 0 y 21 (Nuclear-pIDKE2). El grupo 6 se inoculó de la misma manera que el grupo 5 pero solo en el día 0 (Nuclear-pIDKE2 **(1)**). Adicionalmente, un séptimo grupo, el control negativo, se inmunizó con 50 µg del plásmido pAEC-K6 (este no contiene las secuencias de codificación de los antígenos del VHC).

Se determinó la respuesta del anticuerpo mediante ELISA para detectar la respuesta de Ab frente a las proteínas estructurales del VHC. Se empleó el test de la T de Student para analizar los resultados, se consideraron las diferencias estadísticas para  $p < 0,05$ .

La Figura 3 muestra que es posible aumentar la respuesta inmune frente a los antígenos estructurales del VHC mediante la administración de dos dosis de la mezcla del pIDKE2 con la proteína nuclear con respecto a los componentes individuales, esta formulación (en dos dosis) indujo títulos de Ab frente a las proteínas E1 y E2 de la envuelta del VHC estadísticamente mayores que los obtenidos en los restantes grupos (Figura 3A). Estos títulos de Ab fueron también significativamente mayores que los niveles de Abs frente a la proteína de la cápsida del VHC, generados por la mezcla pIDKE2-Nuclear administrada en una única dosis (Figura 3A). La inoculación de la mezcla en una única dosis indujo siempre niveles menores de Abs entre los grupos inmunizados.

La evaluación de la respuesta linfoproliferativa frente a los antígenos estructurales del VHC (Figura 3B) indicó una respuesta significativamente superior frente a la cápsida en el grupo de animales inmunizados con el pIDKE2-nuclear en 2 dosis, con respecto a los restantes grupos. Los resultados se muestran como el índice de estimulación de los esplenocitos obtenidos de animales inmunizados. Se determinó el índice de estimulación mediante la captación de la ( $H^3$ ) Timidina. Es posible concluir que la inmunización con la mezcla del pIDKE2 y la proteína nuclear genera una estimulación sinérgica de la respuesta inmune inducida frente a los antígenos estructurales del VHC.

#### 40 **Ejemplo 2: Inmunogenicidad de las formulaciones que tienen como componentes un ADN que expresa una poliproteína de la Cápsida-E1-E2 del VHC, y el antígeno de la proteína de la cápsida de VHB**

Con el objetivo de investigar el comportamiento de la respuesta inmune generada por la mezcla del plásmido pIDKE2 con los antígenos de la proteína de otros patógenos, se inocularon 10 ratones BALB/c hembra, de 8 semanas de edad, por grupo, por vía intramuscular, con la mezcla del plásmido anteriormente referido con partículas recombinantes de la cápsida del VHB (HBcAg, Figura 2C). El programa incluyó 2 inoculaciones en los días 0 y 21. Se extrajeron muestras de sangre en las semanas 9 y 19 después de la primera inmunización. Se prepararon los inmunógenos en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se administraron los plásmidos en una dosis de 50 µg, y se inoculó la proteína de la cápsida del VHB en una dosis de 5 µg. Se inoculó el grupo 1 con el plásmido pAEC-K6 (control negativo). Se administró el grupo 2 con la proteína HBcAg. Se vacunó el grupo 3 con pIDKE2. Los grupos 4 y 5 se vacunaron con la mezcla de HBcAg con los plásmidos pIDKE2 y pAEC-K6, respectivamente. Se empleó el test de la T de Student para analizar los resultados estadísticamente, se consideró una diferencia significativa para  $p < 0,05$ .

La figura 4 muestra la respuesta del anticuerpo inducida en ratones de 19 semanas después de la inmunización primaria. La Figura 4A muestra que la mezcla del plásmido pIDKE2 con HBcAg indujo los títulos de Ab frente a la HBcAg, estadísticamente mayores que los observados en el resto de los animales vacunados. No se detectaron diferencias estadísticas entre los grupos inmunizados solo con HBcAg o mezclados con el pAEC-K6. Por tanto, es posible concluir que el plásmido pIDKE2 potencia la respuesta inmune frente a las HBcAg.

Por otra parte, la Figura 4B muestra que la mezcla del plásmido pIDKE2 con HBcAg induce títulos de anticuerpo frente a los antígenos estructurales del VHC mayores que los generados en los animales inmunizados solo con el

pIDKE2. Por tanto HBcAg es también capaz de potenciar la respuesta inmune inducida frente a los antígenos estructurales tras la administración del pIDKE2.

**Ejemplo 3: Inmunogenicidad de las formulaciones que tienen como componentes plásmidos que expresan variantes del VHC y el VHB, y la variante de la proteína del antígeno superficial del VHB**

5 Con el objetivo de demostrar la potenciación de la respuesta inmune generada frente a diferentes antígenos de proteína observada después de la administración simultánea con el plásmido pIDKE2, y para estudiar otros plásmidos con similares propiedades adyuvantes, se inocularon 10 ratones BALB/c hembras, de 8 semanas de edad, por grupo, por vía intramuscular, con la mezcla del plásmido con partículas recombinantes de la HbsAg (Figura 2B). El programa incluyó 3 inoculaciones en los días 0, 21 y 50. Se extrajeron muestras de sangre en la semana 16, después de la inmunización primaria. Todos los inmunógenos se prepararon en solución salina tamponada con fosfato (PBS), excepto un grupo formulado con hidróxido de aluminio. Se inoculó el grupo 1 con la mezcla de 50 µg del plásmido pIDKCo, que contenía la secuencia de codificación de los primeros 176 aa de la proteína de la cápsida del VHC (Dueñas-Carrera y col., Vaccine 2000; 19(7): 992-997), y 5 µg de la HbsAg (pIDKCo-HBsAg). Los grupos 2 a 7 se inocularon con mezclas de ADN y HBsAg en las mismas cantidades, pero utilizando los siguientes plásmidos: grupo 2 (pIDKE1S-HBsAg), el plásmido pIDKE1S (Figura 1, que contenía la secuencia de codificación de los aa 176-363 de la poliproteína del VHC Sec. Id. N° 2); grupo 3 (pAEC-ME-HBsAg), el plásmido pAEC-ME (Figura 1, que contenía la secuencia de codificación de una proteína que incluye diferentes epítomos de los antígenos del VHC, Sec. Id. N°4); grupo 4 (pIDKE2-HBsAg), el plásmido pIDKE2 (Figura 1) que contenía la secuencia de codificación de los aa 1-650 de la poliproteína del VHC, Sec. Id. N° 3; grupo 5 (pIDKE1Sm-HBsAg), el plásmido pIDKE1Sm es idéntico al pIDKE1S excepto porque este incluye 2 inserciones de nucleótidos en la región que codifica la proteína R1 del VHC que cambia el marco de lectura abierto e impide la expresión de esta proteína (Sec. Id. N° 5); grupo 6 (pAEC-d2-HBsAg-HBsAg), el plásmido pAEC-d2-HbsAg contiene la secuencia que codifica el plásmido pAEC-K6 (control negativo, no contiene la secuencia de codificación bajo el control de la unidad transcripcional). Finalmente, los grupos 8 y 9 se inocularon con 5 µg de HbsAg formulada en hidróxido de aluminio o sola, respectivamente. Se empleó la T de Student para analizar los resultados estadísticamente, se consideró una diferencia significativa para  $p < 0,05$ .

[0039] La Figura 5 muestra los títulos de Abs generados frente a la HbsAg, 16 semanas después de la inmunización primaria. Los niveles de Abs inducidos solo por la HbsAg en PBWS fueron estadísticamente inferiores al resto de las variantes evaluadas excepto para la mezcla formada por la HbsAg y el pAEC-K6. Por otra parte, las mezclas de HbsAg con los plásmidos pIDKCo, pIDKE1S, pAEC-ME y pIDKE2 indujeron títulos de Ab frente a la HbsAg estadísticamente superiores a los inducidos por la inmunización con la HbsAg formulada en hidróxido de aluminio o mezclada con el pAEC-K6. La inmunización con la HbsAg formulada con hidróxido de aluminio o mezclada con pAEC-K6, pIDKE1Sm y pAEC-d2-HbsAg indujo niveles similares de títulos de Ab frente a HbsAg. Es posible concluir que la expresión en las células hospedadoras de las variantes de proteínas que incluyen las regiones de aminoácidos del antígeno de E1 de VHC, procedente de los plásmidos administrados, potencia la respuesta inmune generada frente al antígeno de la proteína mezclado con la construcción de ADN.

Listado de Secuencias

<110> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

<120> Formulación de vacuna potenciada mediante la combinación de un ADN con un antígeno

40 <130> Lista de VHC

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

45 <210> 1

<211> 531

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <221> gen

<222> (1)..(528)

<223> Incluye la secuencia que codifica los aa 1 a 176 de la proteína nuclear del VHC

<220>

<223> descripción de la secuencia artificial: pIDKCo

ES 2 393 546 T3

<400> 1

```

atgagcacga atcctaaacc tcaaagaaaa accaaacgta acaccaaccg ccgcccacag 60
gacgtcaagt tcccgggcgg tggtcagatc gttgggaggag ttacctgtt gccgcgcagg 120
ggccccaggt tgggtgtgcg cgcaactagg aagacttccg agcggtcgca acctcgtgga 180
aggcgacaac ctatcccca ggctcgccgg cccgagggca ggtcctgggc ccagcccggg 240
tacccttggc ccctctatgg taacgagggc atgggatggg caggatggct cctgtcacc 300
cgtggctctc ggctagtgg gggccccact gacccccggc gtaggtcgcg taatttgggt 360
aaggtcatcg atacctcac atgcggcttc gccgacctca tggggtacat tccgctcgtc 420
ggcgcccccc tagggggcgc tgccagggcc ctggcgcgat gcgtccgggt tctggaggac 480
ggcgtgaatt atgcaacagg gaatctgccc ggttgcctct tctctctcta a 531

```

<210> 2

<211> 567

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> gen

<222> (1) .. (564)

10 <223> Incluye la secuencia de nucleótidos que codifica los aa 176-363 en la poliproteína del VHC, que corresponde principalmente a la proteína E1.

<220>

<223> descripción de la secuencia artificial: pIDKEIS

<400> 2

```

15 atgttccttt tggctttgct gtcctgtttg accatcccag tttccgccta tgaagtgcgc 60
aacgcgtccg ggggtgacca tgtcacgaac gactgctcca actcaagcat tgtgtatgag 120
gcagacgaca tgatcatgca ccccccgga tgcgtgccct gcgttcggga ggacaacacc 180
tcccgtctgt gggtagcgtc ccccccaaca ctgcgggcca ggaatgccag cgtccccacc 240
acgacaatac gacgccacgt cgatttgctc gttggggcgg ctgctctctg ctccgctatg 300
tacgtggggg atctctgcgg atctgttttc ctggtttccc agctgttcac cttctcgcct 360
cgccggcatg agacagcaca ggaactgcaac tgctcaatct atcccggcca cgtatcagg 420
caccgcatgg cctgggatat gatgatgaac tggtcacctt caacagccct agtggtatcg 480
cagttactcc ggatcccaca agccgtcgtg gacatggtag cggggggccca ctggggagtc 540
ctagcgggcc ttgectacta ctctctaa 567

```

<210> 3

<211> 1953

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> gen

<222> (1)..(1950)

25 <223> Incluye la secuencia de nucleótidos que codifica los aa 1-650 en la poliproteína del HCV, que abarca la cápsida, E1 y una porción de la proteína E2.

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: pIDKE2

<400> 3

ES 2 393 546 T3

```

atgagcacga atcctaaacc tcaaagaaaa accaaacgta acaccaaccg ccgcccacag 60
gacgtcaagt tcccgggcgg tggtcagatc gttgggtggag tttacctggt gccgcgcagg 120
ggccccaggt tgggtgtgcg cgcaactagg aagacttccg agcggtcgca acctcgtgga 180
aggcgacaac ctatccccaa ggctcgccgg cccgagggca ggtcctgggc ccagcccggg 240
tacccttggc ccctctatgg taacgagggc atgggatggg caggatggct cctgtcacc 300
cgtggctctc ggctagttag gggccccact gacccccggc gtaggtcgcg taatttgggt 360
aaggtcatcg ataccctcac atgctggctc gccgacctca tggggtacat tccgctcgtc 420
ggcgccccc tagggggcgc tgcagggcc ctggcgcag gcgccgggt tctggaggac 480
ggcgtgaatt atgcaacagg gaatctgccc ggttgetctt tctctctctt ccttttggct 540
ttgctgtcct gtttgaccat cccagtttcc gcctatgaag tgcgcaacgc gtccgggggtg 600
taccatgtca cgaacgactg ctccaactca agcattgtgt atgaggcaga cgacatgatc 660
atgcacaccc ccgatgctg gccctgctgt cgggaggaca acacctcccg ctgctgggta 720
gcgctcacc ccacactcgc ggccaggaat gccagcgtcc ccaccacgac aatacgacgc 780
cacgtcgatt tgctcgttgg ggcggctgct ctctgctccg ctatgtacgt gggggatctc 840
tgcgatctg ttttctctgt tcccagctg ttcaccttct cgcctcggcg gcatgagaca 900
gcacaggact gcaactgctc aatctatccc ggccacgtat caggtcaccg catggcctgg 960
gatatgatga tgaactggtc acctcaaca gccctagtgg tatcgcagtt actccggatc 1020
ccacaagccg tcgtggacat ggtagcgggg gccactggg gagtcctagc gggccttggc 1080
tactactcca tgggtgggaa ctgggccaag gttttgattg tgatgctact ctttgccggc 1140
gttgacggga cgggaaccta cgtgacaggg gggacggcag cccgcggcgt cagccagttt 1200
acgggcctct ttacatctgg gccgagtcag aaaatccagc ttgtaaatac caacggcagc 1260
tggcatatta accggactgc cctgaactgc aacgactccc tccagaccgg gttccttget 1320
gcgttgtttt acgtgcacag gttcaactcg tccggatgct cagatcgcag gccagctgc 1380
cgccccattg atacgttcga ccaggggtgg ggccccatta cttacgctga gccgcgcagc 1440
ttggaccaga ggccctattg ctggcactac gcacctcaac cgtgtgggat cgtaccgcgc 1500
gcggaggtgt gtggtccagt gtattgttcc actccaagcc ccggttgcgt ggggaccacc 1560
gatcgttccg gcgtccctac gtataactgg ggggagaatg agacggacgt gctgctcctt 1620
aacaacacgc ggccgcgctt gggcaactgg ttggctgta catggatgaa tagcactggg 1680
ttaccaaga cgtgcggggg ccctccgtat aacatcggag gggtcggtaa caacaccttg 1740
acctgcctta cggattgctt ccgcaagcac cccgagggca cttacaccaa atgtggtttg 1800
gggccttggg tgacacctag gtgcttggtc gactacccat acaggctttg gcattacccc 1860
tgactgtca actttaccat cttcaaggtt cggatgtatg tggggggcgt ggagcacagg 1920
cttaccgctg catgcaactg gactcgagga taa 1953

```

<210> 4  
 <211> 1194  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <221> gen  
 <222> (1)..(1191)

10 <223> Incluye la secuencia de nucleótidos que codifica diferentes epítomos de las proteínas del VHC.

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: pAEC-ME

<400> 4

```

atgacgggaa cctacgtgac aggggggacg gcagcccgcg gcgtcagcca gtttacgggc 60
ctctttacat ctggggccgag tcagaaaatc cagcttgtaa ataccaacgg cagctggcat 120
attaaccgga ctgccctgaa ctgcaacgac tccctccaga ccgggttcct tgctgcgttg 180
ttttacgtgc acaggttcaa ctcgtccgga tgctcagatc gcatggccag ctgccgcccc 240
attgatacgt tcgaccaggg gtggggcccc attacttacg ctgagccgcg cagcttgacc 300
cagaggccct attgctggca ctacgcacct caaccgtgtg gtatcgtacc cgcgccggag 360
gtgtgtggtc cagtgtattg tttcactcca agcccgttg tcgtggggac caccgatcgt 420
tccggcgtcc ctacgtataa ctgggggggag aatgagacgg acgtgctgct ccttaacaac 480
acgcggccgc cgctgggcaa ctggtttggc tgtacatgga tgaatagcac tgggttcacc 540
aagacgtgcg ggggccctcc gtataacatc ggaggggtcg gtaacaacac cttgacctgc 600
cctacggatt gcttccgcaa gcacggatcc acccacgtga ccggcggcag ccaggccccg 660
accaccaca gcttcacctc cctgctgcmc cagggcgcca agcagaacgt gcagctgatc 720
gccgacctga tgggctacat cccactggtg ggcgccccac tgggcaagaa gggccacctg 780
agcggccacc gcatggcctg ggacatgatg atgaactggg ccagcaagaa ggccgccagc 840
cgcgccgccg gcttgcaagg cagcaccatg ctggtgagcc acaccgcgt gaccggcggc 900
gtggccggcc acgtgaccag cggcctggtg tccctgttca gccctggcmc cagccagaag 960
atccagctgg tgggctccag cttcagcctg ttccctgttg cctcctgag cagcttgacc 1020
atcaagaaga tgagctactc ctggaccggc gccctggtga cccaagcmc cgccgagaag 1080
aagctgttgt tcaacatcct gggcggctgg gtgaagaaga gcatggtggg caactgggcc 1140
aaggtgaaga agtacaccgg cgacttcgac agcgtgatcg actccaggcc ttaa 1194

```

<210> 5

<211> 569

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: pIDKE1Sm

<220>

<221> gen

10 <222> (1) .. (566)

<223> Incluye la secuencia de nucleótidos que codifica la E1 del VHC con 2 inserciones de nucleótidos que cambian el ORF y origina una pequeña proteína no relacionada.

<400> 5

```

attgttcctt ttggctttgc tgtcctgttt gaccatccca gtttccgcct atgaagtgcg 60
caacgcgtcc ggggtgtacc atgtcacgaa cgactgactc caactcaagc attgtgtatg 120
aggcagaoga catgatcatg cacacccccg gatgcgtgcc ctgcgttcgg gaggacaaca 180
cctcccgtct ctgggtagcg ctcacccccca cactcgcggc caggaatgcc agcgtcccca 240
ccacgacaat acgacgccac gtcgatttgc tcgttggggc ggctgctctc tgctccgcta 300
tgtacgtggg ggatctctgc ggatctgttt tcctcgttcc ccagctgttc accttctcgc 360
ctcgccggca tgagacagca caggactgca actgctcaat ctatcccggc cacgtatcag 420
gtcaccgcat ggctggggat atgatgatga actggtcacc ttcaacagcc ctagtgggat 480
cgcagttact ccggatccca caagcgcctg tggacatggt agcggggggc cactggggag 540
tcctagcggg ccttgccctac tactcctaa 569

```

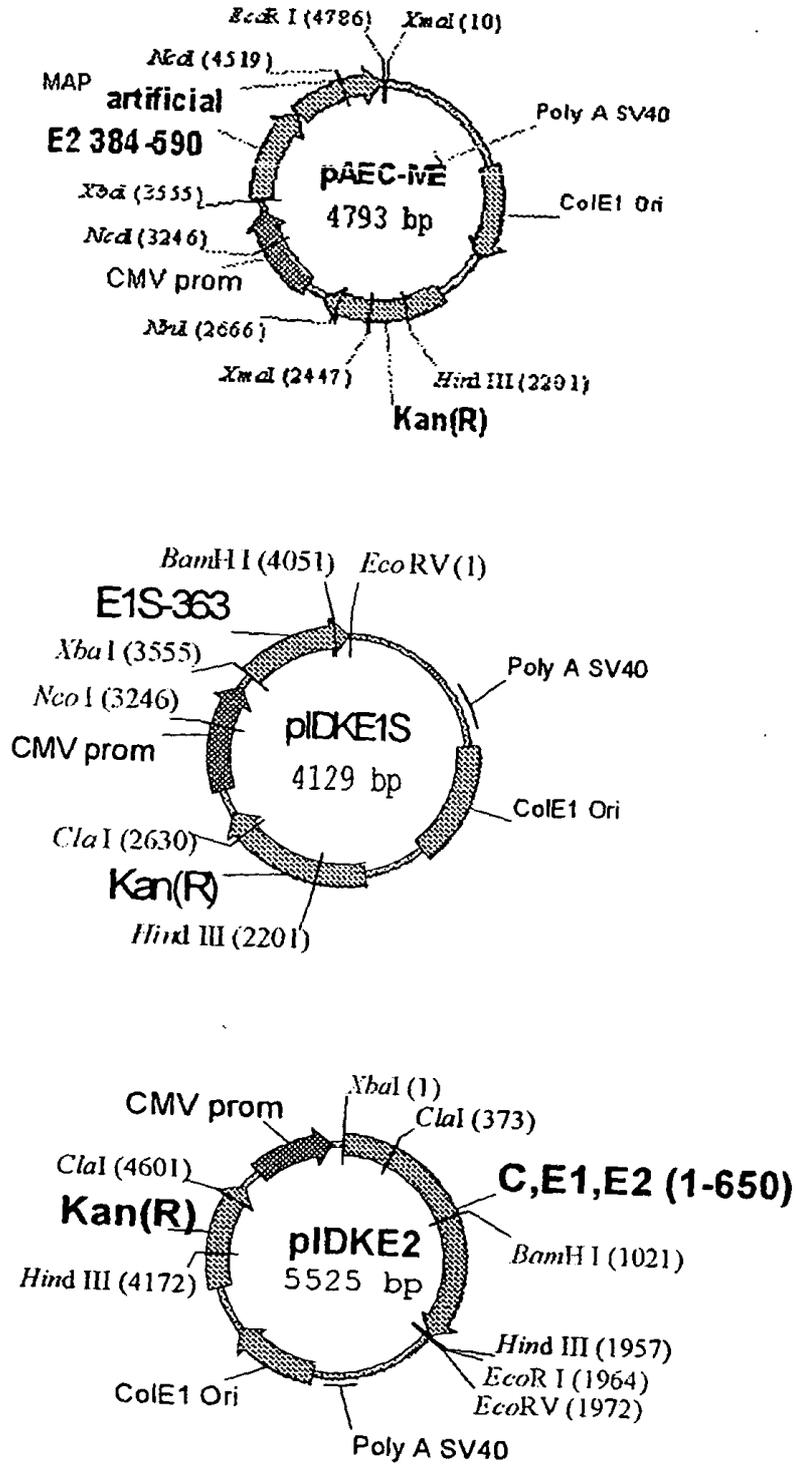
15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una formulación de vacuna que comprende como componentes un ADN que expresa una o más proteínas que incluye regiones del antígeno de E1 del virus de la hepatitis C en la que dicho ADN se identifica mediante la SEQ ID N° 2, 3 o 4, y la proteína de la cápsida del virus de la hepatitis C o B, en la que cada componente de esta formulación actúa como un adyuvante del otro.
2. Una formulación de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, para ser empleada como agente terapéutico y/o preventivo del virus de la hepatitis C.
3. Una formulación de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1, para uso como agente terapéutico y/o preventivo tanto frente al virus de la hepatitis C como al virus de la hepatitis B.

10

Figura 1

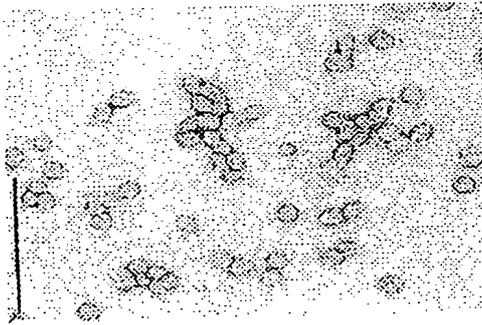


**Figura 2**

**A**



**B**



**C**

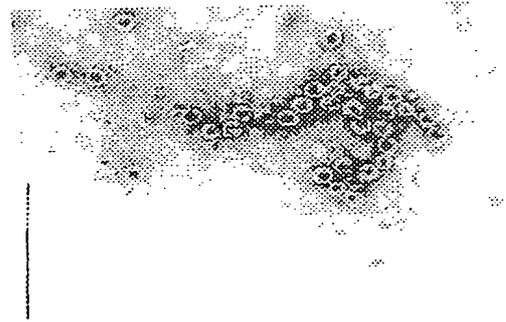
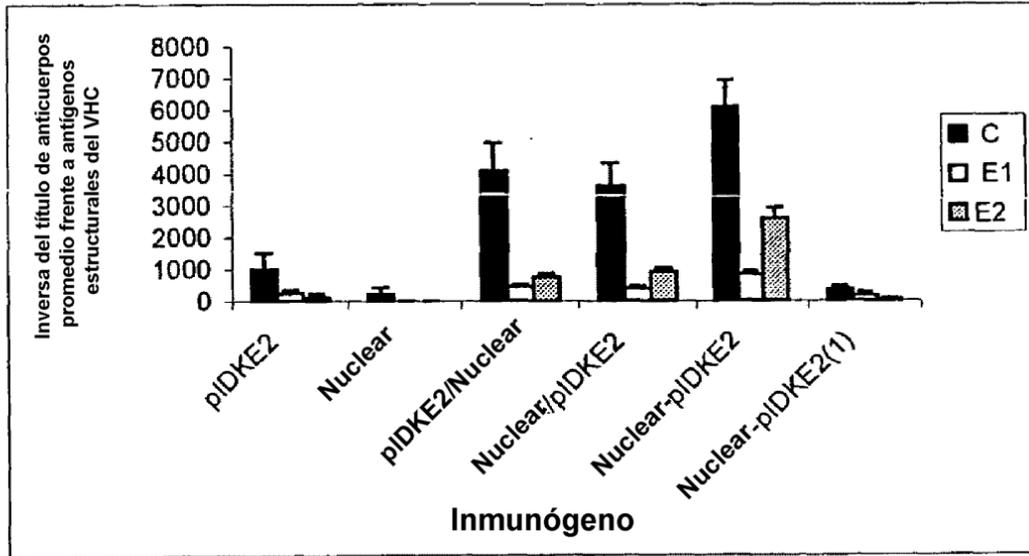
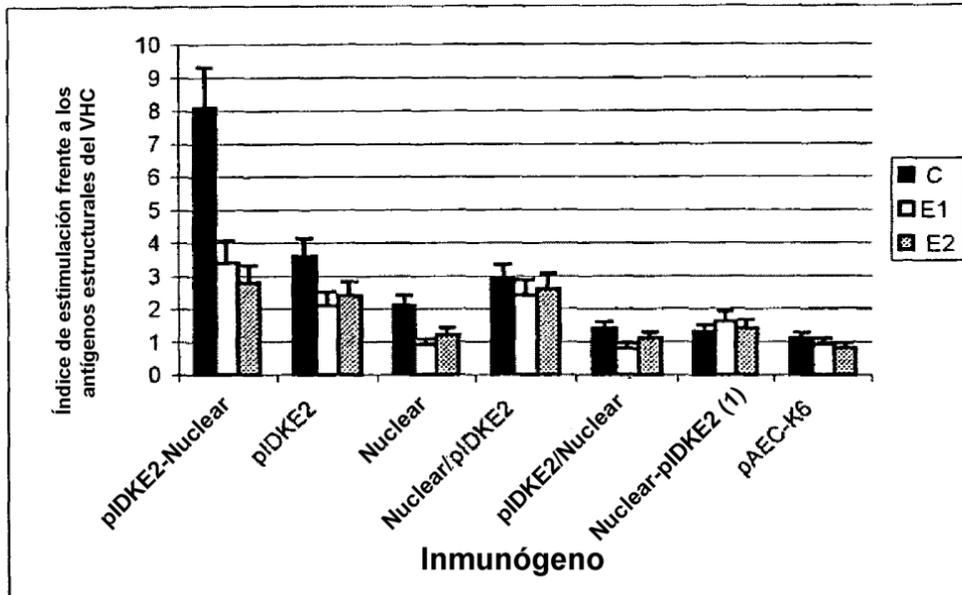


Figura 3

A

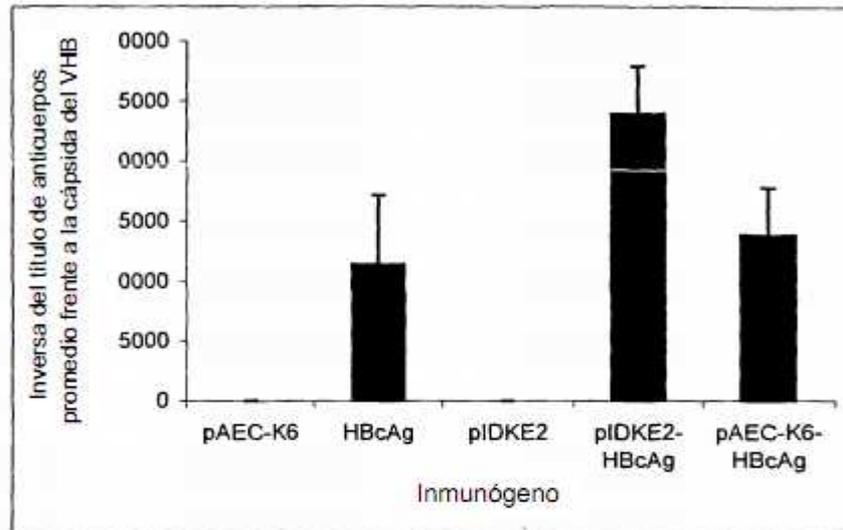


B



**Figura 4**

**A**



**B**

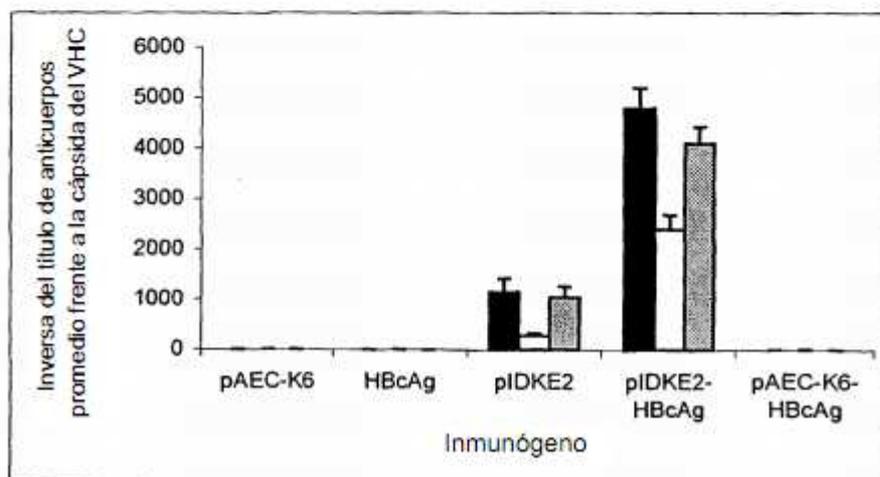


Figura 5

- Grupos
- 1- pIDKCo-HBsAg
  - 2- pIDKE1S-HBsAg
  - 3- pAEC-ME-HBsAg
  - 4- pIDKE2-HBsAg
  - 5- pIDKE1Sm-HBsAg
  - 6- pAEC-d2-HBsAg-HBsAg
  - 7- pAEC-K6-HBsAg
  - 8- HBsAg-AIOH
  - 9- HBsAg

