

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 963**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**A61K 39/385** (2006.01)

**A61K 39/39** (2006.01)

**C07K 14/08** (2006.01)

**C07K 14/18** (2006.01)

**C07K 14/255** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2003 E 03739913 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 1523329**

54 Título: **Partícula viral adyuvante**

30 Prioridad:

**05.07.2002 US 393659 P**

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

**28.11.2013**

73 Titular/es:

**FOLIA BIOTECH INC. (100.0%)  
2750, RUE EINSTEIN, SUITE 330  
QUEBEC CITY, QUEBEC G1P 4R1, CA**

72 Inventor/es:

**LECLERC, DENIS;  
MAJEAU, NATHALIE y  
LOPEZ-MACIAS, CONSTANTINO ROBERTO, III**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 431 963 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

Partícula viral adyuvante

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a una partícula viral que lleva inmunógenos y que tiene actividad de inmunopotenciación o adyuvante. La invención se refiere particularmente a partículas virales recombinantes, en particular para su uso en la mejora de una respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal por medio de estas partículas.

**Técnica antecedente**

10 La vacunación es el método más eficaz para combatir las enfermedades infecciosas. La aparición de nuevas enfermedades víricas (por ejemplo, el virus de la Hepatitis C, el virus de la Inmunodeficiencia Humana) y la resistencia de las bacterias patógenas (*Salmonella typhi*) a los antibióticos son alarmantes. Por lo tanto, la vacunación se convierte en una alternativa eficaz para ayudar a controlar estas enfermedades.

15 En los últimos 15 años, la ingeniería genética permitió la identificación precisa de fragmentos proteicos que son responsables de la respuesta inmunitaria protectora. Por lo tanto, surgieron nuevas estrategias de vacunación. La inmunización de animales con péptidos inmunogénicos apropiados permitió la producción de anticuerpos neutralizantes que pueden controlar enfermedades. La expresión de estos péptidos inmunogénicos en sistemas heterólogos proporcionó las bases de las vacunas de subunidades.

20 A pesar de que se ha demostrado que ciertos oligopéptidos sintetizados químicamente son capaces de estimular la producción de anticuerpos contra la proteína de la cual derivan, por lo general se ha observado que los péptidos por sí mismos son insuficientemente inmunogénicos para servir como vacunas. Es por esto por lo que hay un considerable interés en desarrollar sistemas de presentación de epítopos en los que la secuencia peptídica esté fusionada a una molécula transportadora capaz de formar una estructura macromolecular.

25 La inmunidad específica puede mejorarse por el uso de inmunopotenciadores, tales como adyuvantes, cuando se administra un antígeno a un hospedador. La respuesta inmunitaria está mediada por una diversidad de células del sistema inmunitario. Hay dos tipos de respuesta inmunitaria: inmunidad humoral mediada por anticuerpos, e inmunidad celular mediada principalmente por linfocitos T citotóxicos. Las células presentadoras de antígenos ("APC") procesan y presentan el antígeno tanto a las células B como a las células T. Las células B secretan anticuerpos específicos como resultado de la activación y las células T o bien se convierten en células auxiliares de la respuesta humoral o en células citotóxicas y directamente atacan al antígeno. Se ha mostrado que los adyuvantes aumentan estas respuestas inmunitarias.

35 La presentación inicial de un antígeno induce anticuerpos tanto IgM como IgG, que constituyen la respuesta primaria. No obstante, esta producción de anticuerpos podría decaer con el tiempo. La respuesta secundaria, que principalmente implica la producción de anticuerpos IgG, puede dispararse por la presentación del antígeno secundaria o posterior en el tiempo. Una respuesta secundaria o incluso primaria, sin embargo, no está garantizada meramente por la presentación del antígeno al hospedador.

40 Una dificultad que surge con frecuencia en la administración de un antígeno es la medida en la que responderá el sistema inmunitario. Ciertos antígenos no son muy inmunogénicos ya que tras la administración provocan una respuesta primaria débil o no provocan ninguna respuesta. En esos casos, el sistema inmunitario podría no responder a una exposición secundaria, y por ejemplo, el hospedador podría sufrir la enfermedad o afección que se pretendía prevenir con la inmunización con el antígeno.

En esas situaciones, es común administrar un modulador de la respuesta fisiológica ("PRM"). Un PRM generalmente se define como un compuesto inmunopotenciador. Puede proceder de bacterias, tales como *Bordella pertussis* o *Corynebacterium parvum*. Los PRM también pueden incluir productos químicos tales como polinucleótidos, moléculas fisiológicamente activas tales como hormonas tiroideas y adyuvantes.

45 Los adyuvantes son compuestos que potencian la respuesta de los sistemas inmunitarios cuando se administran con un antígeno, produciendo mayores títulos de anticuerpos y una respuesta prolongada del hospedador. Los adyuvantes usados comúnmente incluyen el Adyuvante Incompleto de Freund, que consiste en una emulsión de agua en aceite, el Adyuvante Completo de Freund, que comprende el anterior con la adición de *Mycobacterium tuberculosis*, y el alumbre. La dificultad, sin embargo, de usar estos materiales en seres humanos, por ejemplo, es que son tóxicos o pueden hacer que el hospedador desarrolle lesiones en el sitio de inyección.

50

Kawamura y Berzofsky describieron otro enfoque en J. Immunol., 136:58 (1986). En este enfoque, se conjugaron anticuerpos anti-Ig, que son reactivos con las inmunoglobulinas presentes en ciertas células B, con ferritina y mioglobina, y se administraron a ratones con Adyuvante Incompleto de Freund. Mejoró la inmunogenicidad de la mezcla, pero no había indicios de la inmunogenicidad de la muestra sin la adición del adyuvante. Además, aunque los adyuvantes tales como el Adyuvante Completo de Freund, el Adyuvante Incompleto de Freund y Montanide pueden mejorar en gran medida la respuesta inmunitaria a un antígeno, sufren algunas desventajas. Cuando se usan con un antígeno en una forma inyectable, normalmente se forman grandes lesiones en el sitio de inyección, una situación que los hace insatisfactorios para este uso en seres humanos, mascotas o en animales de carne. Además, estos adyuvantes no pueden actuar como agentes inmunopotenciadores cuando se administran por vía oral o entérica.

Se sabe en la técnica que pueden modificarse genéticamente de forma relativamente fácil transportadores de inmunógenos o antígenos de diferente naturaleza. Esos sistemas que pueden producirse en plantas y se adaptan fácilmente a esta aplicación son virus de plantas. Se sabe que el virus del mosaico del caupí (CPMV), el virus del mosaico del tabaco (TMV) y el virus del mosaico de la alfalfa (AIMV) se han modificado para la presentación de epítomos de interés. Se sabe que otro vector viral de plantas, el virus X de la patata (PVX), un miembro del grupo de los potexvirus, tolera el transporte de una cubierta de proteína completa. También, las Patentes de Estados Unidos 6.232.099 y 6.042.832, las publicaciones de solicitudes de Patente Internacional con el número WO 97/39134, WO 02/04007, WO 01/66778, WO 02/00169, la solicitud EP 1167530, y Porta, C. y col. (Reviews in Medical Virology, 1998, 8:25-41), todas ellas, describen diferentes variaciones de partículas similares a virus que transportan proteínas foráneas fusionadas con proteínas endógenas. Además, se ha descrito el uso del virus del mosaico de la papaya (PapMV) como un sistema de presentación de epítomos (Ikegami, R., M.Sc. Thesis, National Library of Canada, Ottawa, Ontario).

Considerando el estado de la técnica descrito en el presente documento, aún hay una gran necesidad de compuestos y partículas transportadoras que permitan una inmunización fuerte del ser humano y de animales evitando además el uso de adyuvantes y segundas vacunaciones como se pone en práctica actualmente.

### Divulgación de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. En las realizaciones de la invención desveladas en el presente documento, la referencia a un virus o a una partícula similar a virus (VLP) se entiende como una referencia a PapMV o a VLP PapMV.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un complejo de inmunógeno-transportador que tenga una propiedad de inmunopotenciación, consistente en una partícula similar a virus (VLP) que transporte al menos un inmunógeno fusionado con una proteína o fragmento de la misma de dicha VLP, que pueda usarse en la preparación de una composición para inducir una respuesta inmunitaria frente a la proteína o fragmento de la misma.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición que comprenda una partícula similar a virus (VLP) y una proteína o un extracto derivado de un virus, bacteria o parásito, para su uso como una vacuna.

En el presente documento se desvela un método para inmunopotenciar una respuesta inmunitaria en un ser humano o un animal, que comprende administrar a dicho ser humano o animal un transportador de inmunógenos consistente en una partícula similar a virus (VLP) que transporta al menos un inmunógeno fusionado con una proteína o fragmento de la misma de dicha VLP, o administrar una VLP o un fragmento de la misma de forma concomitante con un antígeno no unido directamente a dicha VLP.

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican un complejo de inmunógeno-transportador que consiste en una partícula similar a virus (VLP) que transporta al menos un inmunógeno fusionado al extremo C-terminal de la proteína de la cubierta de dicha VLP, teniendo dicho complejo de inmunógeno-transportador la capacidad de ensamblarse cuando se expresa en una célula vegetal, una célula animal o un microorganismo.

Además, en el presente documento se desvela el uso de un virus del mosaico de la papaya como adyuvante.

Para los fines de la presente invención, a continuación se definen los siguientes términos.

La expresión "proteína quimérica" se crea cuando dos o más genes que normalmente codifican dos proteínas distintas se recombinan, ya sea de forma natural o como resultado de la intervención humana, para codificar una proteína que es una combinación de todo o parte de cada una de esas dos proteínas.

La expresión "proteína de fusión de la cápside" significa una proteína de fusión en la que uno de los genes de la fusión codifica una proteína de la cápside de un virus de plantas.

Se entiende que la expresión "inmunidad protectora", como se usa en el presente documento, significa la capacidad de un animal, tal como un mamífero, ave o pez, de resistir (retraso de la aparición de los síntomas o reducción de la gravedad de los síntomas), como resultado de su exposición al antígeno de un patógeno, a la enfermedad o muerte que se produciría de otra forma tras el contacto con el patógeno. La inmunidad protectora se consigue por uno o más de los siguientes mecanismos: inmunidad mucosa, humoral o celular. La inmunidad mucosa es principalmente el resultado de los anticuerpos IgA secretores (sIGA) en las superficies mucosas de los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario. Los anticuerpos sIGA se generan tras una serie de eventos mediados por células procesadoras de antígenos, linfocitos B y T, que dan como resultado la producción de sIGA por los linfocitos B en tejidos del cuerpo revestidos de mucosa. La inmunidad mucosa puede estimularse por una vacuna oral. El resultado primario de la inmunidad protectora es la destrucción del patógeno o la inhibición de su capacidad de replicarse.

La expresión "inmunidad humoral", como se usa en el presente documento, significa el resultado de los anticuerpos IgG y los anticuerpos IgM en el suero.

La expresión "inmunidad celular", como se usa en el presente documento, puede conseguirse a través de los linfocitos T citotóxicos o a través de la hipersensibilidad de tipo retardado en la que están implicados macrófagos y linfocitos T, así como a través de otros mecanismos en los que están implicadas las células T sin necesidad de anticuerpos.

Un "virus recombinante" es uno en el que el material genético de un virus se ha combinado con otro material genético.

Se entiende que los términos "polipéptido" o "péptido", como se usan en el presente documento, significan una molécula en la que hay al menos cuatro aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

La expresión "ácido nucleico viral", como se usa en el presente documento, puede ser el genoma (o la mayor parte del mismo) de un virus, o una molécula de ácido nucleico complementaria en la secuencia de bases a dicho genoma. Una molécula de ADN que es complementaria al ARN viral también se considera ácido nucleico viral. Una molécula de ARN que es complementaria en la secuencia de bases al ADN viral también se considera ácido nucleico viral.

La expresión "partícula similar a virus" (VLP), como se usa en el presente documento, se refiere a partículas que se autoensamblan que tienen un aspecto físico similar a las partículas víricas e incluyen pseudovirus. Las partículas similares a virus pueden carecer de o poseer copias disfuncionales de ciertos genes del virus natural, y esto puede hacer que la partícula similar a virus sea incapaz de realizar alguna función que es característica del virus natural, tal como la replicación y/o el movimiento desde una célula a otra.

Se pretende que el término "vacuna", como se usa en el presente documento, signifique la proteína de fusión, cualquier partícula de la cual forme parte esa proteína, o cualquier preparación tal como material vegetal de la que forme parte esa proteína.

Se pretende que el término "inmunopotenciador", como se usa en el presente documento, signifique una sustancia que, cuando se mezcla con un antígeno, potencia la inmunogenicidad o la antigenicidad y proporciona una respuesta inmunitaria superior. Se reconocerá que puede potenciar la expresión de coestimuladores en macrófagos y otras células presentadoras de antígenos.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra una micrografía electrónica de PapMV purificado;

La figura 2 ilustra el análisis por SDS-PAGE tricina de la CP de PapMV (A) y el marcaje por técnicas de inmuno-oro que muestra que la fusión está expuesta en la superficie de la VLP PapMV (B);

Las figuras 3A a 3F ilustran micrografías electrónicas de PapMV y VLP PapMV ensambladas *in vitro*;

La figura 4 ilustra la acumulación de leucocitos inducida por PapMV en el modelo de la bolsa de aire;

La figura 5 ilustra la respuesta inmunitaria a PapMV. En ratones (6 para cada concentración) se inyectó IP una vez PapMV o ISS (solución salina isotónica);

La figura 6 ilustra una respuesta inmunitaria a PapMV. En ratones (6 para cada concentración) se inyectó IP una vez PapMV o ISS (solución salina isotónica);

La figura 7 ilustra una evaluación de la potencia de PapMV como adyuvante de la ovoalbúmina;

Las figuras 8A y 8B ilustran la caracterización de la respuesta inmunitaria al PapMV y a péptidos del VHC derivados de las glicoproteínas de superficie E1 y E2 del VHC; y

5 La figura 9 ilustra una transferencia de Western que muestra la migración específica de la CP de PapMV hacia ganglio linfático y bazo con una inyección intraperitoneal.

#### Método para llevar a cabo la invención

En el presente documento se desvela una partícula similar a virus que transporta un inmunógeno fusionado con proteínas endógenas virales, que forma por lo tanto un nuevo tipo de complejo de inmunógeno-transportador que también es capaz de realizar inmunopotenciación o que tiene un efecto adyuvante.

10 En el presente documento se desvela una clase de transportadores que cuando se unen genéticamente a un inmunógeno o hapteno pueden potenciar la respuesta inmunitaria del hospedador frente al inmunógeno o hapteno, independientemente de si el complejo se administra por vía parenteral, entérica u oral. Además, su uso no da como resultado la formación de grandes lesiones en los lugares de inyección.

15 Las células accesorias tales como macrófagos, linfocitos B y células dendríticas son esenciales para la inducción de las respuestas inmunitarias dependientes de células T. Las células accesorias presentan antígenos a las células T restringidas al MHC y producen coestimuladores asociados a membrana y secretados que potencian la proliferación y diferenciación de los linfocitos T. Por lo tanto, la presencia de células accesorias competentes estimula las respuestas inmunitarias dependientes de células T, y su ausencia conduce a respuestas deficientes. Es posible que los macrófagos en reposo y los linfocitos B vírgenes, sin estimular, presentados por dichas células presentadoras de antígenos (APC) no estimulen las células T CD4+ vírgenes y podrían incluso inducir tolerancia de células T. Por el contrario, las células dendríticas y los macrófagos activados y las células B expresan coestimuladores, así como altos niveles de APC. Un mecanismo de acción del inmunógeno-transportador desvelado en el presente documento es potenciar la expresión de los coestimuladores en macrófagos y otras APC. Por esto, la administración de inmunógenos o de antígenos proteicos con los transportadores de inmunógenos desvelados en el presente documento, que actúan simultáneamente como un adyuvante, promueve la inmunidad mediada por células y la producción de anticuerpos dependiente de células T. Los inmunógenos son extremadamente eficaces para generar inmunidad sistémica cuando se administran acoplados junto con un inmunógeno-transportador desvelado en el presente documento.

20 25 30 En una primera realización, la invención proporciona un complejo que comprende un inmunógeno acoplado a un transportador que es una partícula similar a virus (VLP) en el extremo C-terminal de la proteína de la cubierta, de tal manera que la molécula transportadora potencie la respuesta inmunitaria de un hospedador al inmunógeno cuando el complejo se administra a dicho hospedador, donde el inmunógeno puede comprender un antígeno o un hapteno y la molécula transportadora comprende una partícula integral de PapMV.

35 40 Una vía para obtener una buena respuesta de las células B es presentar el antígeno de forma organizada. Se ha demostrado que los epítomos organizados de forma repetitiva forman enlaces cruzados con el receptor de las células B eficazmente e inducen una rápida respuesta de IgM, independiente de los linfocitos T, seguida después de una respuesta de IgG. Por lo tanto, una buena estrategia para incrementar la inmunogenicidad de los epítomos y el reconocimiento y la presentación al sistema inmunitario es la expresión de los epítomos inmunodominantes de manera organizada como en la superficie de un virus de plantas tal como el PapMV. Particularmente, el PapMV cumple varias características de un buen adyuvante y transportador porque es un antígeno filogenéticamente distante, es exógeno al sistema inmunitario de mamíferos, es muy complejo desde el punto de vista molecular y es una estructura organizada que tiene un alto peso molecular.

45 El solicitante ha reconocido que, sorprendentemente, una estructura cristalina y repetitiva no solo se reconoce por el sistema inmunitario innato, sino que tiene además un efecto adyuvante sobre el sistema inmunitario de un hospedador inmunizado.

50 En una realización de la presente invención, se proporciona un método en el que el uso de un alto número de copias del virus del mosaico de la papaya (PapMV) en forma de varilla, benigno, produce inmunógenos conectados a subunidades de proteínas de la cubierta del virus. Cuando se ensamblan, las partículas del virus comprenden formaciones helicoidales largas de más de 1.000 proteínas de fusión idénticas (que son típicamente moléculas de fusión de proteínas de cubierta--proteínas foráneas) por virión. Generalmente, la parte del inmunógeno estará expuesta en la superficie externa de las partículas del virus en el extremo C-terminal de la proteína de la cubierta.

La estructura de las proteínas de la cápside de los virus de plantas y animales cumple estos requisitos y puede modificarse por ingeniería genética para presentar péptidos inmunogénicos derivados del patógeno u otras fuentes

con los que se produce el adyuvante de vacuna. La proteína de la cubierta del virus del mosaico de la papaya (PapMV), de acuerdo con la presente invención, es un candidato excelente para el desarrollo de dicho inmunopotenciador inmunógeno-transportador. Este virus tiene forma de varilla cristalina y es muy repetitivo (1.200 copias de la misma subunidad por virión). Recientes experimentos de inmunización con PapMV indican que este virus induce una respuesta inmunitaria muy fuerte en ratones y es un excelente vector para el desarrollo de una vacuna. Este virus transportador de inmunógenos puede modificarse por ingeniería genética con varios péptidos inmunogénicos, por ejemplo, de las proteínas de la envuelta de la superficie del VHC, péptidos derivados de la proteína porina de *Salmonella typhi*, y el péptido  $\alpha$ 9-23 de la insulina. El conjunto de proteínas de la cubierta de fusión transportadas por partículas similares a virus (VLP) se define como un inmunógeno-transportador que tiene propiedades adyuvantes o inmunopotenciadoras.

De acuerdo con la presente invención, es posible proporcionar una composición para inmunopotenciar o reforzar una reacción inmunitaria frente a un antígeno dado. Se sabe particularmente que las moléculas pequeñas a menudo actúan solo de forma deficiente como inmunógenos en su capacidad para inducir anticuerpos en un sistema *in vivo*. Cuando se unan a un virus transportador de inmunógenos, que por sí mismo es antigénico, darán lugar a una respuesta de anticuerpos mejorada frente a las moléculas más pequeñas. La molécula pequeña unida al transportador de inmunógenos de este sistema puede denominarse hapteno o antígeno, y puede variar en tamaño desde pequeño a bastante grande. En un ejemplo de esta combinación, de interés para el campo del cuidado de la salud, una pequeña parte del antígeno de superficie de la Hepatitis B, que comprende una secuencia de determinados aminoácidos, que no es antigénica por sí misma, puede unirse covalentemente a la VLP, y el conjugado resultante induce anticuerpos en un sistema *in vivo* que pueden reaccionar de forma cruzada con el antígeno de superficie nativo de la VLP y también fuertemente con el virus de la hepatitis completo. Este sistema inmunógeno-transportador puede ser la base para una vacuna eficaz contra una enfermedad codificada por el hapteno o antígeno.

En el presente documento se desvelan sistemas inmunógeno-transportador, como se describe más adelante, que se producen convenientemente por técnicas de ADN recombinante, que son útiles para proporcionar vacunas inmunogénicas tanto univalentes como multivalentes, y que emplean el concepto de inmunógeno-transportador descrito anteriormente.

Un inmunógeno se acopla a una VLP transportadora para formar un complejo de inmunógeno-transportador y después puede usarse en un hospedador para provocar una respuesta inmunitaria. El inmunógeno puede ser específico o reconocerse por estructuras de superficie presentes en las células T, células B, células NK y macrófagos, pero no por estructuras de la superficie celular asociadas a las APC de clase I o de clase II.

El inmunógeno al que se acopla la VLP transportadora puede comprender péptidos, haptenos, carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos, y partes de virus, bacterias, parásitos y otros organismos enteros. Independientemente del inmunógeno seleccionado, debe acoplarse a la VLP transportadora de tal forma que no interfiera con el reconocimiento del inmunógeno por el sistema inmunitario del hospedador como una entidad antigénica.

El complejo de inmunógeno-transportador puede usarse como vacuna para inducir una respuesta inmunitaria en el hospedador. El complejo inicialmente puede administrarse en una dosificación apropiada para inducir una respuesta inmunitaria. Esto puede continuarse por el refuerzo con el complejo o inmunógeno solo. Una variación de este enfoque puede incluir la formación de uno o más complejos de inmunógeno-transportador en los que una o más formas de un inmunógeno están acopladas a una o más VLP transportadoras y se administra una pluralidad de dichos complejos.

El objetivo de administrar el complejo de inmunógeno-transportador es proporcionar protección al hospedador en forma de inmunidad contra el antígeno y evitar el uso de adyuvantes que tengan efectos secundarios indeseados.

En una realización, el antígeno puede ser un inmunógeno tan pequeño como un hapteno o puede ser relativamente grande, tal como parte de un virus. El tamaño y tipo de antígeno no es crítico para la puesta en práctica de esta invención. Puede usarse cualquier antígeno para el que se desee una respuesta inmunitaria en un hospedador. Sin embargo, la invención es especialmente útil para haptenos pequeños débilmente inmunogénicos.

Una vez que se ha formado el complejo o complejos de inmunógeno-transportador, el complejo o complejos pueden administrarse al hospedador. No es necesario que el régimen de administración difiera de cualquier otro programa de vacunación aceptado generalmente. Puede usarse una sola administración en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmunitaria eficaz. Como alternativa, pueden usarse otros regímenes de administración inicial del complejo seguidos del refuerzo con antígeno solo o uno o más complejos. De forma similar, el refuerzo con el complejo o antígeno puede realizarse en momentos bastante posteriores a la administración inicial si los títulos de anticuerpo están por debajo de niveles aceptables.

Otra realización de la presente invención es que como las VLP tienen una estructura multivalente regular y helicoidal auténtica que puede ser más inmunogénica que la agregación de proteínas o subunidades libres de proteínas, también pueden ensamblarse fácilmente a partir de un ácido nucleico codificante. Además, la mayor estabilidad de la partícula puede proporcionar una exposición de larga duración de la parte de inmunógeno al sistema inmunitario.

5 La parte de virus a la que se une el inmunógeno preferentemente está dispuesta en la superficie externa de la VLP PapMV para usarse como adyuvante en la vacunación para potenciar una respuesta inmunitaria. De esta manera, cuando la partícula procede de PapMV, la parte del transportador se dispone en el extremo carboxi. Esto puede dar como resultado un mejor ensamblaje en comparación con el ensamblaje de partículas que tienen la segunda parte en otra localización de la CP, y puede potenciar el reconocimiento inmunitario de la segunda parte en la superficie de la partícula.

El desarrollo de vacunas de péptidos usando un vector de virus de plantas permite producir vacunas de forma masiva en condiciones seguras. Con el PapMV recombinante es de esperar que se obtenga hasta 1 gramo de virus recombinante por kilogramo de hojas frescas infectadas.

15 La administración de 200 pg de virus recombinante, o complejo de inmunógeno-transportador, que corresponde a 14 µg de péptido, puede ser suficiente para la inmunización. Una hectárea de papaya infectada entonces podría ser suficiente para la vacunación de 5 millones de pacientes. Además, el cultivo de las plantas es barato y eficaz. La agricultura es la forma más barata de producir una biomasa porque no necesita un equipo sofisticado.

20 El virus o pseudovirus puede ensamblarse en la célula hospedadora para producir partículas de virus infecciosas que comprenden ácido nucleico y proteína de fusión. Esto puede permitir la infección de células adyacentes por la partícula de pseudovirus o virus infeccioso y la expresión de la proteína de fusión en las mismas.

25 La célula hospedadora puede infectarse inicialmente con virus o pseudovirus en forma de partículas (es decir, en varillas ensambladas que comprenden ácido nucleico y una proteína) o, como alternativa, en forma de ácido nucleico (es decir, ARN tal como ARN viral; ADNc o transcritos run-off (transcritos obtenidos por un protocolo de transcripción en el que el plásmido se corta después del ADN insertado) preparados a partir de ADNc) siempre que el ácido nucleico del virus usado para la infección inicial pueda replicarse y causar la producción de partículas de virus enteros que tengan la proteína quimérica.

30 La primera parte (viral) de la proteína de fusión puede ser cualquier proteína, polipéptido o partes de los mismos, procedentes del virus del mosaico de la papaya incluyendo cualquier versión modificada genéticamente de los mismos (tales como deleciones, inserciones, reemplazos de aminoácidos y similares). De acuerdo con las reivindicaciones adjuntas, la primera parte procederá de una proteína de la cubierta del virus del mosaico de la papaya (o una versión modificada genéticamente de la misma). Una molécula de proteína de fusión puede ensamblarse con otras moléculas de proteínas de fusión o con la proteína de la cubierta natural en un virión transportador de inmunógenos.

35 De acuerdo con las composiciones y proteínas de fusión de la invención, la partícula procede del potexvirus PapMV, y la segunda parte está dispuesta en el extremo C-terminal de la proteína de la cubierta. En PapMV, el extremo C-terminal de la proteína de la cubierta forma un dominio en el exterior del virión.

40 De acuerdo con los polinucleótidos de la invención, un polinucleótido que codifica la parte de inmunógeno se inserta en el extremo del polinucleótido que codifica el extremo C-terminal de la parte viral, de tal forma que después de la traducción, la proteína de fusión tenga la parte viral en un extremo y la parte de inmunógeno en el extremo opuesto. No es necesario que la parte viral comprenda una proteína de la cubierta del virus entera, sino que sigue siendo una elección alternativa.

Otra realización de la presente invención está constituida por un virus o pseudovirus modificado genéticamente para expresar la proteína de fusión. En el presente documento también se desvela una célula hospedadora infectada con dicho virus o pseudovirus.

45 Preferentemente, la célula hospedadora usada para replicar el virus o pseudovirus es una bacteria, donde el virus es un virus de plantas, aunque pueden usarse células vegetales, células de insecto, células de mamífero y bacterias con virus que se repliquen en dichas células. La célula preferentemente es una bacteria tal como *E. coli*, aunque pueden ser útiles otras formas de bacterias y otras células, tales como las células mencionadas anteriormente. La célula puede ser una célula hospedadora natural para el virus del que procede la partícula similar a virus, pero esto no es necesario.

50 La partícula similar a virus entera se usa para la presentación estable y de larga duración de epítopos peptídicos para la vacunación de animales.

El PapMV y las partículas similares al virus PapMV parecen ser muy estables y pueden almacenarse fácilmente a temperatura ambiente. Soportan temperaturas muy altas y condiciones adversas ya que los virus de plantas han evolucionado para resistir condiciones muy difíciles que se encuentran en el entorno. Esta es una ventaja muy importante cuando la vacuna tiene que llegar a personas que están viviendo en países pobres, en regiones en las que es difícil el acceso, o para la conservación durante un periodo prolongado.

Como alternativa, la VLP descrita en el presente documento puede usarse sola como inmunopotenciador o adyuvante para potenciar una respuesta inmunitaria en seres humanos o animales contra antígenos diana. Es preferible que la VLP adyuvante o inmunopotenciadora se administre concomitantemente con el antígeno contra el cual tiene que inducirse una respuesta inmunitaria. Sin embargo, la VLP adyuvante puede administrarse antes o después, dependiendo de las necesidades, de la administración del antígeno a los pacientes, humanos o animales.

La presente invención se entenderá más fácilmente mediante la referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan para ilustrar la invención en lugar de para limitar su alcance.

### Ejemplo I

#### Preparación de inmunógeno-VLP transportadora

La avidez de los péptidos de afinidad seleccionados descritos en el presente documento se mejorará mediante la multimerización de los péptidos. La multimerización se realizará en la superficie del virus del mosaico de la papaya (PapMV), que es un miembro del grupo de los potexvirus. PapMV tiene una estructura de tipo varilla que se forma por ensamblaje de las subunidades de la CP. Una partícula de virus contiene 1.200 subunidades. Se realizará una fusión del péptido seleccionado con la CP de PapMV. La fusión se realizará para exponer el péptido en la superficie de las partículas de PapMV después del ensamblaje *in vitro* desde una CP de PapMV expresada y purificada a partir de un sistema de expresión de *E. coli*. El ensamblaje de la CP viral después asegura la multimerización del péptido y tiene una avidez mejorada considerablemente.

El gen de la proteína de la cubierta (CP) se clonó y desarrollo en un sistema de ensamblaje *in vitro* usando la proteína de la cubierta (CP) del virus del mosaico de la papaya (PapMV) (Fig. 1). La CP de PapMV se produjo en *E. coli* en una gran cantidad (Fig. 2a) y produjo partículas similares a virus PapMV *in vitro* que son muy similares a las del virus natural (Fig. 2b). Por primera vez se demuestra que una CP de PapMV recombinante puede ensamblarse en partículas similares a virus *in vitro*. La fusión de varios péptidos al extremo C de la CP se permite por ensamblaje *in vitro* y da lugar a partículas similares a virus que son más grandes que el virus natural debido a la fusión (Fig. 3).

### Ejemplo II

#### Efecto de inmunopotenciación de inmunógeno-VLP transportadora

Con frecuencia se usa un adyuvante para aumentar la respuesta inmunitaria de una vacuna candidata. La potenciación de la respuesta inflamatoria favorece la migración de más fagocitos al sitio de inyección, lo cual, a su vez, tiene como resultado una mejor presentación del antígeno por las células presentadoras de antígenos (APC). Para aumentar la respuesta inmunitaria de la vacuna candidata se han usado alumbre, emulsiones, micropartículas y citocinas tales como GM-CSF. Se confirmó que PapMV inducía por sí mismo un episodio inflamatorio, eliminando de esta manera la necesidad de adyuvantes adicionales. Se usó el modelo de bolsa de aire para examinar si PapMV inducía un acontecimiento proinflamatorio *in vivo*. En este modelo, se inyecta aire estéril bajo el dorso de ratones los días 0 y 3. El día 7, pueden inyectarse agentes proinflamatorios en la bolsa de aire y medirse la respuesta inflamatoria. Este modelo representa estrechamente los sitios de inyección subcutánea.

La inyección de PapMV en la bolsa de aire murina dio como resultado la acumulación de aproximadamente  $8,5 \times 10^6$  leucocitos, en comparación con  $0,8 \times 10^6$  leucocitos en los ratones en los que se inyectó vehículo (PBS) (Fig. 4). En la bolsa de aire se acumularon neutrófilos (85 %) y monocitos (15 %) 6 horas después de la inyección de PapMV. Aunque cantidades tan bajas como 1  $\mu\text{g}$  de PapMV eran suficientes para inducir la acumulación de los leucocitos, se produjo una acumulación máxima cuando se inyectaron 100  $\mu\text{g}$  de PapMV. Esta acumulación fue similar a la inducida por la inyección de 1  $\mu\text{g}$  de LPS, un potente factor proinflamatorio. Estos resultados demuestran claramente que PapMV puede inducir eficazmente un episodio inflamatorio. Esta observación muestra claramente que el PapMV se percibe por el sistema inmunitario que induce la señalización y el reclutamiento de células implicadas en la defensa de nuestro organismo. Es probable que PapMV induzca la señalización a través de la inmunidad innata.

Además, en el presente experimento se demostró que PapMV induce una respuesta humoral fuerte y de larga duración en ratones (Fig. 5). En 10 ratones se inyectaron tres concentraciones de PapMV; 1, 10 y 100  $\mu\text{g}$ . Se indujo eficazmente una respuesta de anticuerpos primaria en ratones BALB/c inmunizados con PapMV independientemente de la vía de inmunización (Fig. 5). Se detectaron altos títulos el día 5 después de la inmunización. Se observó una curva clásica de una respuesta primaria de IgM. Alrededor del día 20, no había

respuesta de IgM, incluso después del refuerzo de los ratones con más virus. La respuesta de IgG en ratones inmunizados sigue la cinética clásica. Se detectaron altos títulos de anti-PapMV el día 12 después de inmunización y aumentaron proporcionalmente después del refuerzo con este virus. El análisis de los isotipos de IgG mostró una preferencia en la producción de IgG2b e IgG1 durante la fase primaria y secundaria de la respuesta de anticuerpos (Ab). Los títulos de IgG3 aumentaron durante la fase de memoria de la respuesta de Ab. Estos datos muestran que PapMV puede inducir una respuesta de Ab eficaz en ratones. Se indujeron eficazmente respuestas primarias y secundarias así como una memoria de Ab de larga duración. La producción preferente de IgG1 sugiere una liberación preferente de IL-4. La IL-4 favorece el cambio de clase a este tipo de IgG. Por lo tanto, en estos ratones podría preverse un equilibrio hacia una respuesta TH2. La ausencia de IgG2a indica la ausencia de liberación de IFN- $\alpha$ , ya que esta citocina se ha implicado directamente en el cambio de clase hacia este isotipo de IgG. Considerados en conjunto, estos datos mostraron la capacidad de PapMV de inducir una respuesta de anticuerpos eficaz y de larga duración. Este resultado sugiere que las partículas de PapMV son un vector excelente para el desarrollo de una vacuna humoral. Entonces, la fusión de un inmunógeno de interés con la VLP se reconocerá también por el sistema inmunitario y desencadenará una respuesta inmunitaria fuerte contra el epítipo de interés.

Además, se descubrió que las VLP PapMV migran específicamente a los ganglios linfáticos y al bazo después de la inyección intraperitoneal o subcutánea en ratones BALB/c (Fig. 6). Este resultado indica que las VLP PapMV son excelentes transportadores porque migran de forma eficaz a los sitios de aparición de la respuesta inmunitaria.

Los datos experimentales demuestran que el antígeno de PapMV induce una respuesta de anticuerpos eficaz en ratones (Fig. 5). De hecho, se inducen eficazmente respuestas primarias y secundarias así como una memoria de anticuerpos de larga duración (Fig. 6). Varias vías de inmunización produjeron cantidades eficazmente grandes de anticuerpos. Únicamente la inmunización oral no tuvo como resultado una respuesta inmunitaria. Es probable que el NaHCO<sub>3</sub> usado para neutralizar el ácido del estómago dañara las partículas del virus y afectara a la inmunogenicidad de las partículas. Estaban presentes cantidades de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 incluso 350 días después de una inyección de 100  $\mu$ g de PapMV (Fig. 6). Como IgG2a e IgG3 están presentes y persisten, se puede deducir que se induce una respuesta TH1 con PapMV. Esto sugiere que las partículas de PapMV son excelentes vectores para el desarrollo de una respuesta inmunitaria humoral a un antígeno foráneo. La fusión de un epítipo de interés a la partícula de PapMV debería ayudar a desencadenar una respuesta inmunitaria humoral contra el epítipo de interés.

Los datos experimentales obtenidos usando el modelo de bolsa de aire en el dorso de ratones demostraron que PapMV potencia la respuesta inflamatoria y favorece la migración de fagocitos al sitio de inoculación (Fig. 6). Este resultado confirma que PapMV induce por sí mismo un episodio inflamatorio, eliminando de esta manera la necesidad de estrategias adyuvantes adicionales que pretenden mejorar la presentación del antígeno por las células presentadoras de antígenos. Se obtuvieron resultados similares con partículas similares a virus (VLP) que llevaban la fusión de péptidos específicos generados *in vitro* a partir de proteínas recombinantes (Fig. 6). El reclutamiento fue muy rápido ya que se observó el máximo de células entre 6 y 9 horas después del tratamiento (datos no mostrados). Además, las partículas de PapMV son eficaces para inducir una respuesta inmunitaria a la ovoalbúmina, una proteína que se sabe que no es inmunogénica (Fig. 7). Esto se comprobó inyectando en ratones (Balb/C), por vía intraperitoneal, 2 mg de ovoalbúmina, una proteína que se sabe que es un inmunógeno muy débil, o en combinación con 50 o 100  $\mu$ g de PapMV. Se realizaron las inyecciones en 6 ratones por tratamiento y se recogieron muestras 0, 4, 8, 12 y 20 días después de la inyección. Solo se realizó una inyección para cada tratamiento. Se detectó una respuesta inmunitaria dos veces más fuerte a la ovoalbúmina en presencia de PapMV aunque la ovoalbúmina fuera un inmunógeno débil.

Estas observaciones demuestran que las partículas de PapMV se perciben rápidamente como foráneas por el sistema inmunitario de los mamíferos, lo cual a su vez induce la señalización y el reclutamiento de células implicadas en la defensa del organismo.

### Ejemplo III

#### **Virus de la hepatitis C como diana de vacunación**

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus de ARN de cadena positiva que produce enfermedades hepáticas agudas y crónicas. La fase aguda de la infección generalmente está asociada con síntomas leves, pero puede conducir a una cirrosis y carcinoma hepatocelular. En todo el mundo están infectadas más de 170 millones de personas, lo que supone cuatro veces más que el caso del VIH. En los próximos años, el número de muertes por enfermedades asociadas con el VHC incluso puede sobrepasar la tasa de muertes producida por el SIDA. En este momento, las terapias actuales contra el VHC no son satisfactorias. La única terapia disponible es el interferón (IFN), pero la mayoría de los VHC son resistentes debido a la inhibición de la proteína quinasa inducible por interferón (PKR) por la proteína E2 del VHC.

Se sabe que el 20 % de los pacientes infectados por VHC elimina de forma natural el virus. Esta observación sugiere que el sistema inmunitario puede eliminar los virus si reacciona de forma eficaz. Esto también sugiere que se podría ayudar a los pacientes infectados de forma crónica si se reforzara su sistema inmunitario con una vacuna terapéutica contra el VHC que pudiera ayudar a eliminar la infección viral mediante la inducción de anticuerpos neutralizantes contra el virus.

Los dos epítomos elegidos se encuentran en la superficie del virión de VHC. Se ha demostrado que el epítomo de E1 (aminoácidos 285-303) y el epítomo de E2 (aminoácidos 512-536) son fuertemente inmunogénicos en pacientes que han eliminado la infección viral (David et al., 2001). Se modificó PapMV por ingeniería genética para que llevara en su extremo C-terminal la fusión del péptido E1 y E2 de VHC, que pueden ensamblarse para formar partículas similares a virus PapMV *in vitro* (Fig. 3).

Se eligieron tres epítomos que se encuentran en la superficie del virión de VHC de E1 y E2 fuera de HVR-1 en la región conservada de las glicoproteínas de la envuelta viral. Se demostró que un epítomo de E1 (aminoácidos 285-303) y dos epítomos de E2 (aminoácidos 512-536 y 528-546) eran fuertemente inmunogénicos en pacientes que han eliminado la infección viral. Además, se demostró que un epítomo de E2 (aminoácidos 512-536) desencadenaba la producción de anticuerpos neutralizantes que se encontraban en los sueros de pacientes que eliminaban la infección. Estas tres regiones son buenos candidatos para el desarrollo de una vacuna de VHC porque están conservadas entre los subtipos y cepas de VHC y están localizadas fuera de la región hipervariable de las glicoproteínas de la envuelta. Las construcciones PapMV-E1 y PapMV-E2 se expresaron en *E. coli*. Las proteínas recombinantes se purificaron y ensamblaron *in vitro*. El ensamblaje de la CP recombinante con las fusiones de E2 de VHC generan rVLP que son similares a la CP natural recombinante de control excepto porque parecen ligeramente más grandes debido a la fusión.

Se inmunizaron ratones con las VLP recombinantes que se produjeron *in vitro*. Se extrajeron LPS usando una columna de polimixina y se inyectaron en ratones por vía intraperitoneal y subcutánea. Se usaron 1, 10 y 100 µg de VLP y se inyectaron tres ratones para cada tratamiento. La respuesta inmunitaria al péptido y al PapMV se analizó por ELISA. Se observó que la IgG estaba dirigida al péptido así como a la superficie de las VLP (Fig. 8). Este resultado muestra que puede usarse PapMV recombinante para desencadenar una respuesta inmunitaria excelente en la superficie de epítomos y usarse como vacuna sin ayuda de adyuvantes.

#### Ejemplo IV

##### Inmunización contra la fiebre tifoidea

La fiebre tifoidea es una infección aguda del sistema reticuloendotelial, el tejido linfático intestinal y la vesícula biliar que se produce por la bacteria *Salmonella typhi*. En todo el mundo aún es una enfermedad significativa que afecta a más de 16 millones de personas, de las que 600.000 no sobreviven a la infección. La mayoría de las infecciones afectan a niños y adultos jóvenes, y pueden prevenirse por vacunación. Actualmente se dispone de diferentes tipos de vacunas: 1) Vacuna parenteral de células enteras conservada con fenol, inactivada térmicamente (Wyeth-Amherst) administrada por vía intramuscular o subcutánea. 2) Vacuna parenteral de células enteras inactivada con acetona y deshidratada. 3) Vacuna parental de polisacárido Vi purificada (no desnaturalizada) (Aventis) que se administra por inyección en el deltoides. 4) Cepa Ty21a gal E Vi-negativa atenuada, usada como una vacuna oral viva.

La bacteria parental inactivada (tipo 1-3) puede producir respuestas inmunitarias indeseadas debido a la complejidad del lipopolisacárido (LPS) y el número de antígenos presentados que inducen efectos secundarios indeseables. Además, los polisacáridos Vi son antígenos independientes del timo (Robins y Robins, 1984) que, según se demostró, tenían una buena eficacia en los ensayos de campo pero, como también se sabe, son ineficaces para inducir la memoria inmunológica. Se necesitan varias exposiciones al antígeno para mantener la protección, lo que hace que este enfoque sea apropiado únicamente para viajeros que visitan áreas endémicas. Las vacunas disponibles actualmente no están adaptadas para personas que viven permanentemente en áreas contaminadas. La vacuna basada en bacterias atenuadas (tipo 4) puede producir náuseas, vómitos y dolor abdominal. Tampoco se recomienda administrar esta vacuna a pacientes que padecen inmunodepresión, enfermedades intestinales, diarrea, que toman antibióticos o son mujeres embarazadas o niños de menos de 6 años. Esta vacuna tiene que conservarse a 4° C porque es sensible al calor y no debe congelarse. La sensibilidad de ty21A a las condiciones adversas supone un problema cuando se desea alcanzar poblaciones que viven en países pobres con climas tropicales, que son las regiones más afectadas por el tífus.

Se demostró que una proteína de membrana de *S. typhi* denominada porina era un buen inmunógeno porque induce tanto una respuesta inmunitaria de anticuerpos como una respuesta inmunitaria celular en ratones y seres humanos y podía proteger a los ratones frente a *S. typhi*. Las porinas son las proteínas más abundantes en la membrana de bacterias Gram-negativas y funcionan como canales de difusión pasivos para moléculas de bajo peso molecular. Estas proteínas presentan un alto grado de homología tanto estructural como funcional y, por lo tanto, se

5 supone que tiene un antecesor común. Se demostró que dos epítomos pequeños correspondientes al bucle 6 y 7 de la porina de *S. typhii* que están expuestos en la superficie de las bacterias estaban implicados en mecanismos protectores inducidos por inmunización con porinas. Esas regiones son específicas para *S. typhii* y son epítomos excelentes para el desarrollo de una vacuna de subunidad recombinante. Los presentes solicitantes han clonado en el extremo C-terminal de la CP de PapMV el bucle 6 de la porina *S. typhii*. La proteína recombinante se purificó y se produjeron partículas similares a virus PapMV in vitro con ARN como se ha descrito anteriormente (Fig. 3F).

Se entiende que la invención no se restringe a las realizaciones preferidas anteriores y que son posibles modificaciones siempre que estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende un adyuvante capaz de potenciar una respuesta inmunitaria en un animal y uno o más antígenos foráneos, comprendiendo dicho adyuvante un Virus del Mosaico de la Papaya (PapMV) o una partícula similar al virus PapMV que comprende proteína de la cubierta de PapMV, siendo capaz dicha proteína de la cubierta de ensamblarse para formar dicha partícula similar a virus, donde dichos uno o más antígenos foráneos están fusionados o unidos covalentemente al extremo C-terminal de la proteína de la cubierta de dicho PapMV o partícula similar al virus PapMV de tal forma que dichos uno o más antígenos foráneos están dispuestos en la superficie externa de dicho virus o partícula similar a virus y donde dicha composición es adecuada para usarse como una vacuna.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicho adyuvante comprende una partícula similar al virus PapMV y dicho uno o más antígenos foráneos están fusionados o unidos covalentemente al extremo C-terminal de la proteína de la cubierta de dicha partícula similar al virus PapMV.
3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho uno o más antígenos foráneos están fusionados al extremo C-terminal de la proteína de la cubierta.
- 15 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en la que dicho adyuvante comprende una partícula similar al virus PapMV que comprende proteína de la cubierta modificada genéticamente.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 o 4, en la que dichos uno o más antígenos foráneos son inmunógenos que tienen más de una especificidad.
- 20 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4 o 5, en la que dichos uno o más antígenos foráneos proceden de uno o más virus, bacterias o parásitos.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5 o 6, en la que dichos uno o más antígenos foráneos comprenden un epítipo antigénico de hepatitis C o un epítipo antigénico de *Salmonella typhi*.
8. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, en la que dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria sistémica.
- 25 9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, en la que dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta inmunitaria celular o una combinación de las mismas.
10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7, en la que dicha respuesta inmunitaria es una respuesta de memoria de anticuerpos de larga duración.
- 30 11. Un polinucleótido que codifica una proteína de fusión, comprendiendo dicha proteína de fusión proteína de la cubierta del Virus del Mosaico de la Papaya (PapMV) y uno o más antígenos foráneos fusionados al extremo C-terminal de dicha proteína de la cubierta, siendo capaz dicha proteína de fusión de ensamblarse para formar una partícula similar a virus.
- 35 12. Una proteína de fusión recombinante que comprende proteína de la cubierta del Virus del Mosaico de la Papaya (PapMV) y uno o más antígenos foráneos fusionados al extremo C de dicha proteína de la cubierta, siendo capaz dicha proteína de fusión de ensamblarse para formar una partícula similar a virus.
13. La proteína de fusión recombinante de la reivindicación 12, en la que dicha proteína de fusión es una proteína recombinante producida en *E. coli*.
- 40 14. El polinucleótido de la reivindicación 11, o la proteína de fusión recombinante de la reivindicación 12 o 13, en la que dicha proteína de la cubierta es una proteína de la cubierta modificada genéticamente.
15. El polinucleótido de la reivindicación 11 o 14, o la proteína de fusión recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 12, 13 o 14, donde dichos uno o más antígenos foráneos comprenden un epítipo antigénico del virus de la hepatitis C o un epítipo antigénico de *Salmonella typhi*.
- 45 16. Una partícula similar al Virus del Mosaico de la Papaya (PapMV) que comprende una pluralidad de proteínas de fusión recombinantes, comprendiendo cada una de dichas proteínas de fusión recombinantes proteína de la cubierta de PapMV y uno o más antígenos foráneos fusionados al extremo C-terminal de dicha proteína de la cubierta, donde dichas proteínas de fusión recombinantes son capaces de ensamblarse para formar una partícula similar a virus, y

donde la partícula similar a virus es capaz de actuar como un adyuvante.

17. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, o la partícula similar al virus PapMV de la reivindicación 16, para usarse como una vacuna en un animal que lo necesita.
- 5 18. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, o la partícula similar al virus PapMV de la reivindicación 16, para usarse para inducir una respuesta inmunitaria en un animal que lo necesita.
19. La composición o la partícula similar al virus PapMV de acuerdo con la reivindicación 18 para el uso de acuerdo con la reivindicación 18, para administración parenteral, entérica u oral a dicho animal.
- 10 20. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, o la VLP PapMV de la reivindicación 16, en la fabricación de un medicamento.
21. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que dicho medicamento es una vacuna.
22. El uso de acuerdo con la reivindicación 20 o 21, en el que dicho medicamento es para inducir una respuesta inmunitaria en un animal que lo necesita.
- 15 23. La composición o la partícula similar al virus PapMV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17, 18 o 19 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17, 18 o 19, o el uso de acuerdo con la reivindicación 22, donde el animal es un ser humano.
- 20 24. Un Virus del Mosaico de la Papaya (PapMV) o una partícula similar al virus PapMV que comprende proteína de la cubierta de PapMV, siendo dicha proteína de la cubierta capaz de ensamblarse para formar dicha partícula similar a virus, para usarse como un adyuvante de la vacunación para potenciar una respuesta inmunitaria a uno o más antígenos foráneos que no están unidos a dicho PapMV o a dicha VLP PapMV o están fusionados o unidos covalentemente al extremo C-terminal de la proteína de la cubierta de dicho PapMV o dicha VLP PapMV en un animal que lo necesita.
- 25 25. El PapMV o partícula similar al virus PapMV de acuerdo con la reivindicación 24 para el uso de acuerdo con la reivindicación 24, donde dicha partícula similar al virus PapMV comprende proteína de la cubierta modificada genéticamente.
26. El PapMV o partícula similar al virus PapMV de acuerdo con la reivindicación 24 o 25 para el uso de acuerdo con la reivindicación 24 o 25, donde dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria sistémica.
- 30 27. El PapMV o partícula similar al virus PapMV de acuerdo con la reivindicación 24 o 25 para el uso de acuerdo con la reivindicación 24 o 25, donde dicha respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta inmunitaria celular o una combinación de las mismas.
28. El PapMV o partícula similar al virus PapMV de acuerdo con la reivindicación 24 o 25 para el uso de acuerdo con la reivindicación 24 o 25, donde dicha respuesta inmunitaria es una respuesta de memoria de anticuerpos de larga duración.
- 35 29. El PapMV o partícula similar al virus PapMV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24, 25, 26, 27 o 28 para el uso de acuerdo con la reivindicación 24, 25, 26, 27 o 28, donde dicho PapMV o partícula similar al virus PapMV es para administración parenteral, entérica u oral a un animal.
30. El PapMV o partícula similar al virus PapMV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24, 25, 26, 27, 28 o 29 para el uso de acuerdo con la reivindicación 24, 25, 26, 27, 28 o 29, donde dichos uno o más antígeno foráneos son inmunógenos que tienen más de una especificidad.
- 40 31. El PapMV o partícula similar al virus PapMV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 30, donde dichos uno o más antígeno foráneos proceden de uno o más virus, bacterias o parásitos.
- 45 32. El PapMV o partícula similar al virus PapMV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 31, donde dichos uno o más antígeno foráneos comprenden un epítipo antigénico de hepatitis C o un epítipo antigénico de *Salmonella typhi*.

33. El PapMV o partícula similar al virus PapMV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 32, donde dichos uno o más antígeno foráneos y dicho PapMV o partícula similar al virus PapMV son para coadministración a dicho animal.
- 5 34. El PapMV o partícula similar al virus PapMV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 o 32 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 32, donde dicho PapMV o partícula similar al virus PapMV es para administración a dicho animal antes o después de la administración de dichos uno o más antígenos foráneos.
- 10 35. El PapMV o partícula similar al virus PapMV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 33 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 33, donde dichos uno o más antígenos foráneos están fusionados o unidos covalentemente al extremo C-terminal de la proteína de la cubierta de dicho PapMV o partícula similar al virus PapMV.
- 15 36. El PapMV o partícula similar al virus PapMV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 33 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 33, donde dichos uno o más antígenos foráneos están fusionados al extremo C-terminal de la proteína de la cubierta.
37. El PapMV o partícula similar al virus PapMV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 34 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 32 o 34, donde dichos uno o más antígenos foráneos no están unidos a dicho PapMV o partícula similar al virus PapMV.
- 20 38. El PapMV o partícula similar al virus PapMV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 o 37 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 37, donde dicho animal es un ser humano.
39. El PapMV o partícula similar al virus PapMV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 o 37 para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 37, donde dicho animal es un animal no humano.
- 25 40. Un método para producir una partícula similar al Virus del Mosaico de la Papaya (PapMV) *in vitro*, comprendiendo dicho método:
- (a) expresar en una célula hospedadora *E. coli* una proteína de la cubierta de PapMV clonada fusionada por su extremo C-terminal a uno o más antígenos foráneos y
- 30 (b) permitir que la proteína de fusión de la cubierta expresada se ensamble para formar dicha partícula similar a virus, donde la partícula similar a virus es un adyuvante para potenciar una respuesta inmune a dichos uno o más antígenos foráneos en un animal que lo necesita, y donde dichos uno o más antígenos foráneos están dispuestos en la superficie externa de dicha partícula similar a virus.
41. El método de acuerdo con la reivindicación 40, donde dicha proteína de la cubierta es una proteína de la cubierta modificada genéticamente.
- 35

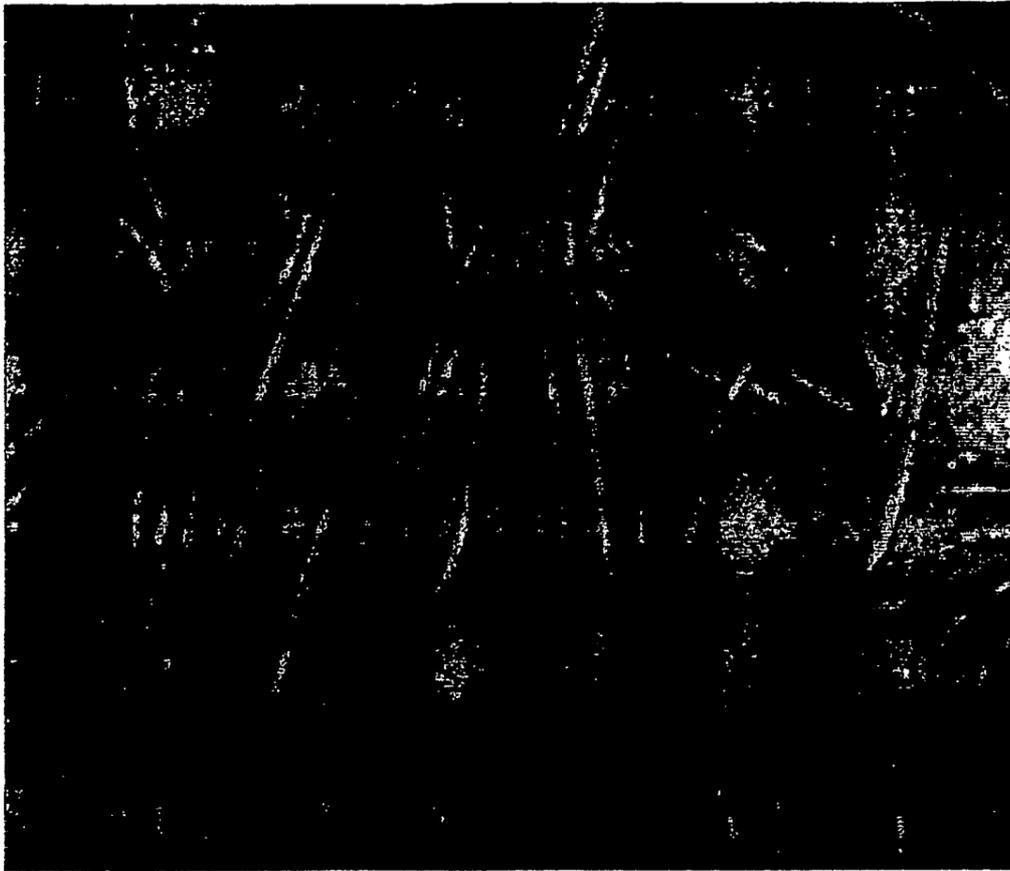
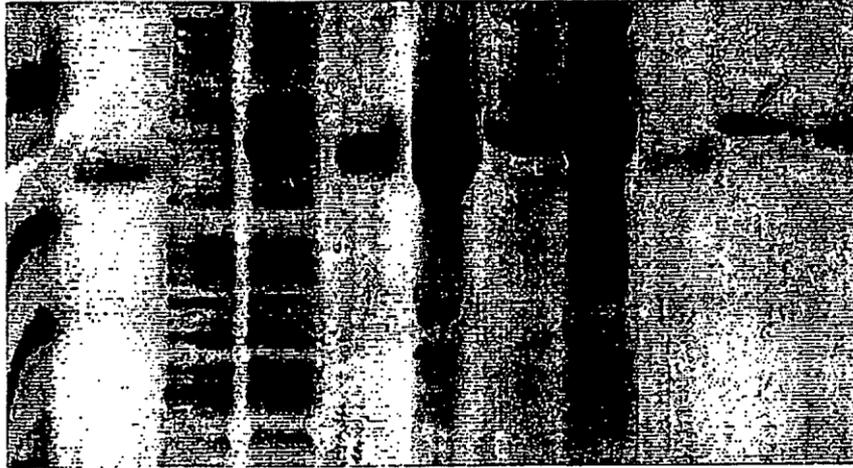


Fig. 1

A

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



B

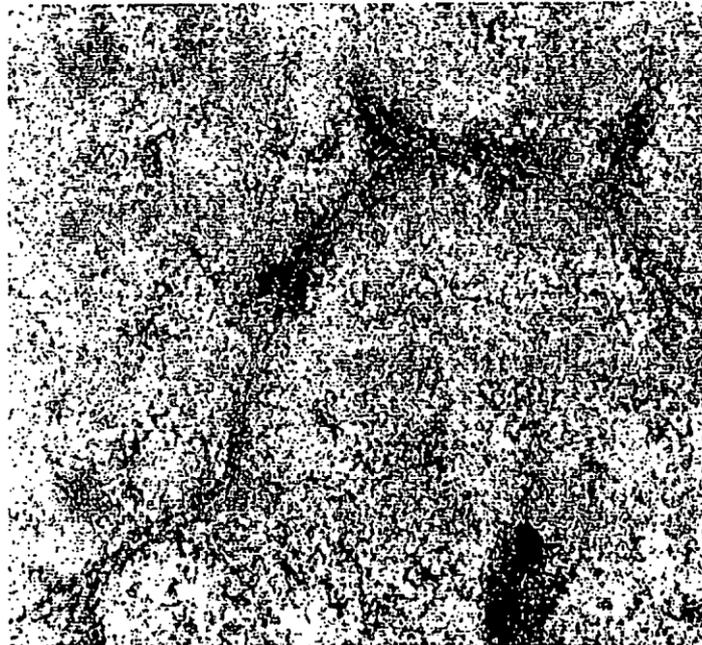


Fig. 2

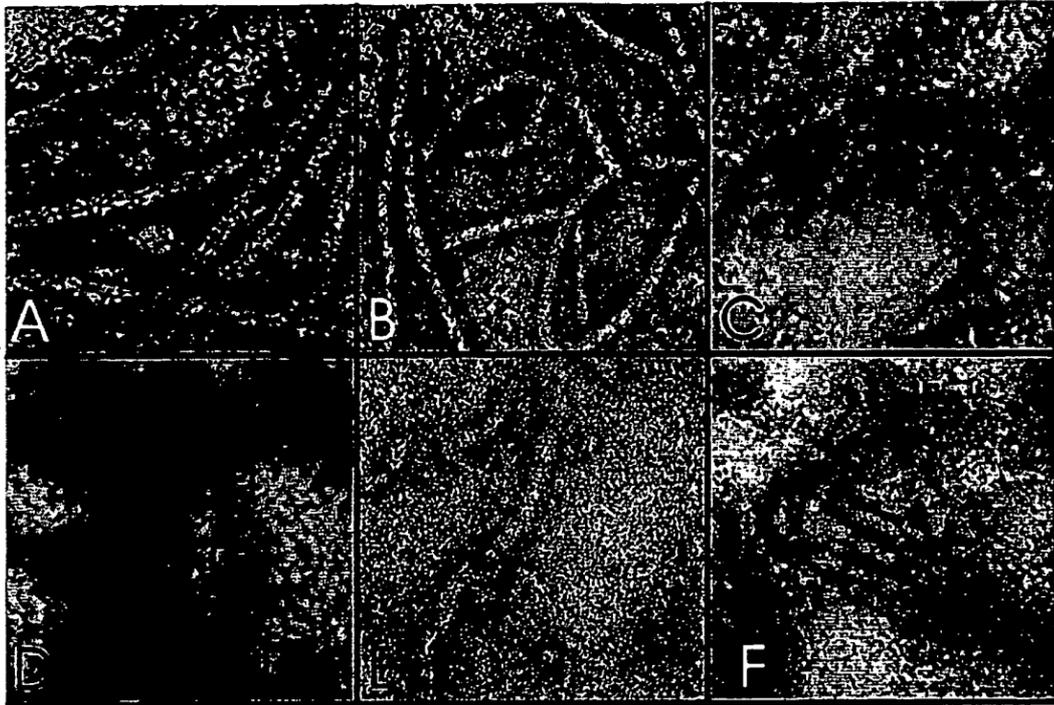


Fig. 3

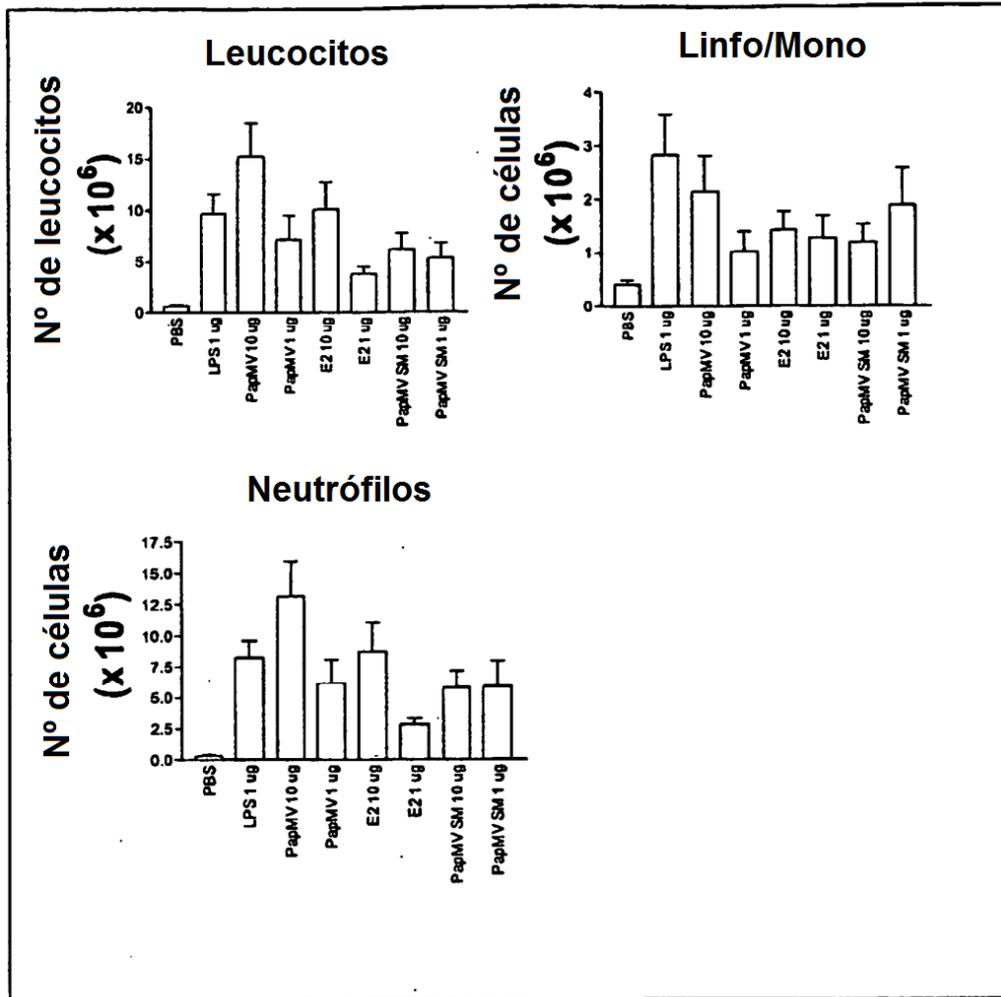


Fig. 4

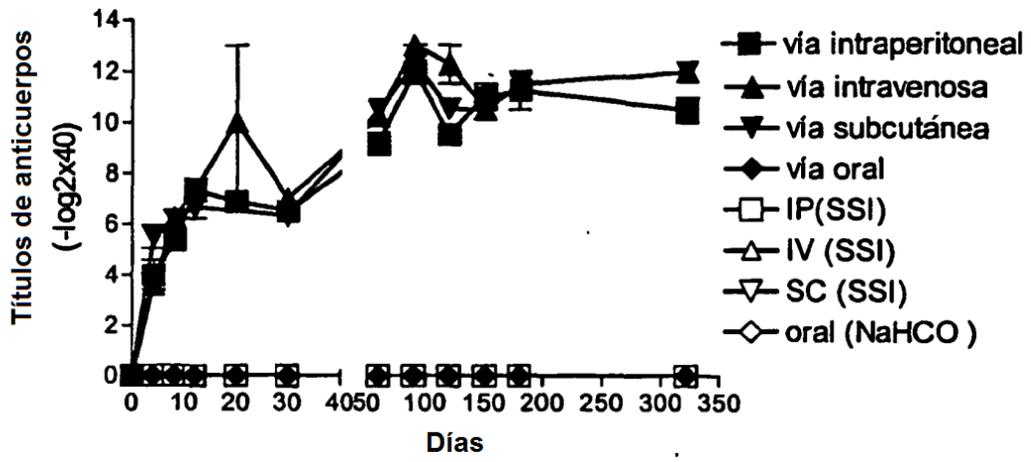


Fig. 5

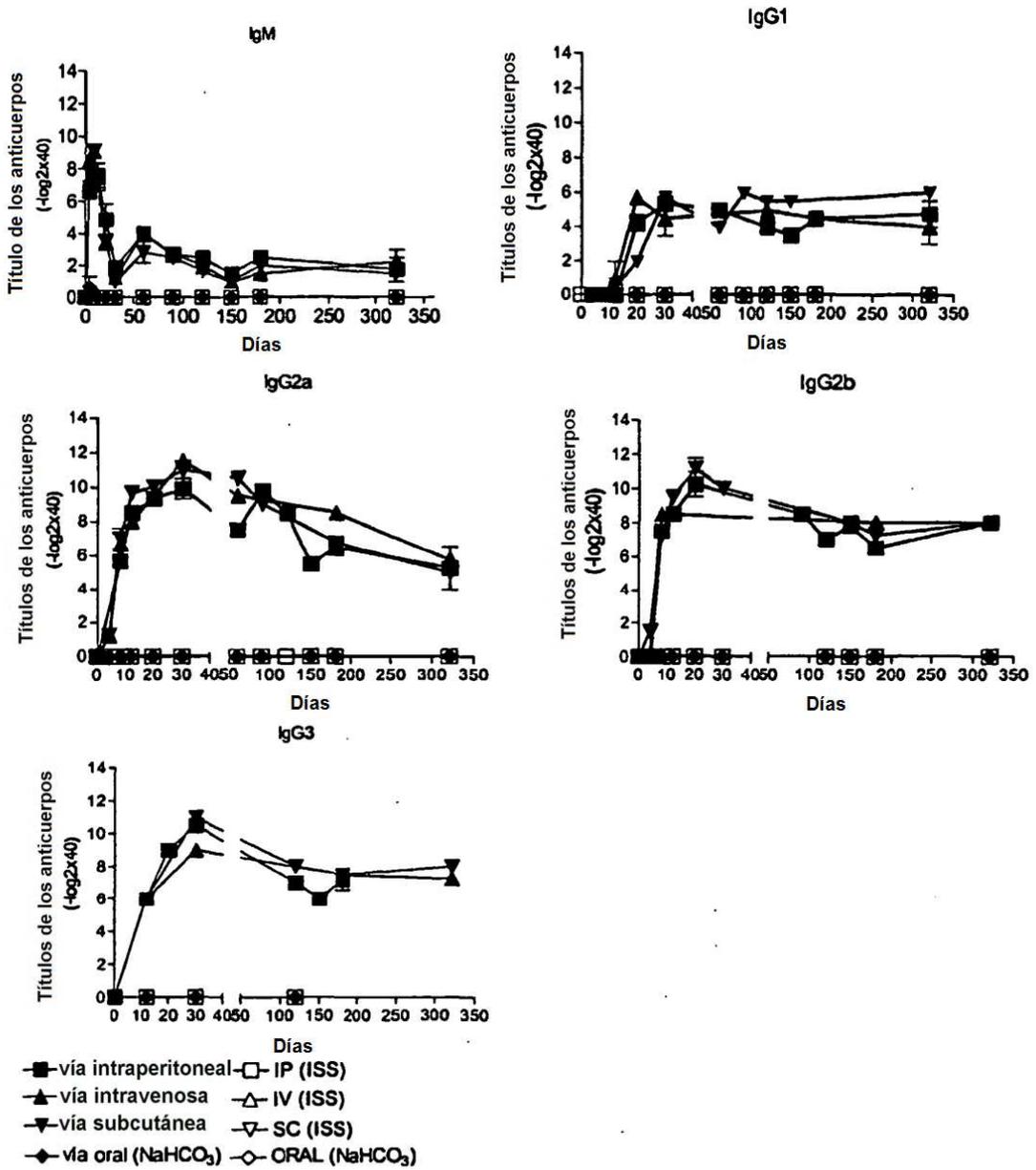


Fig. 6

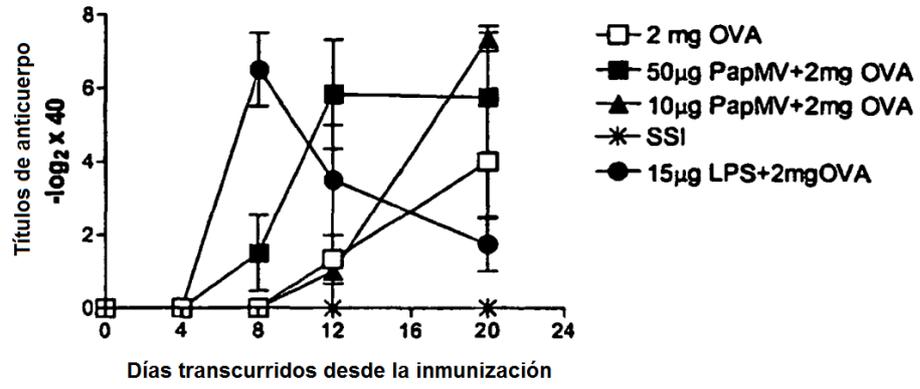
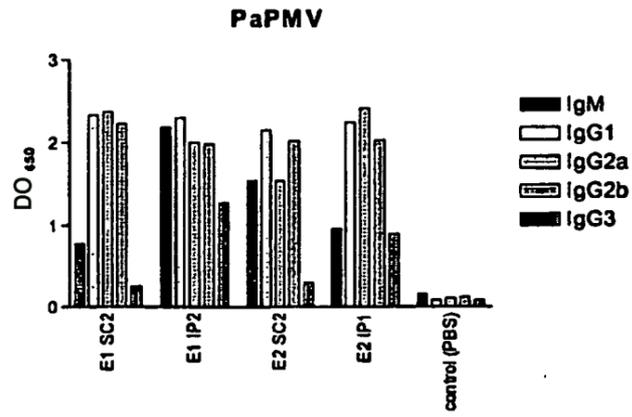


Fig. 7

A



B

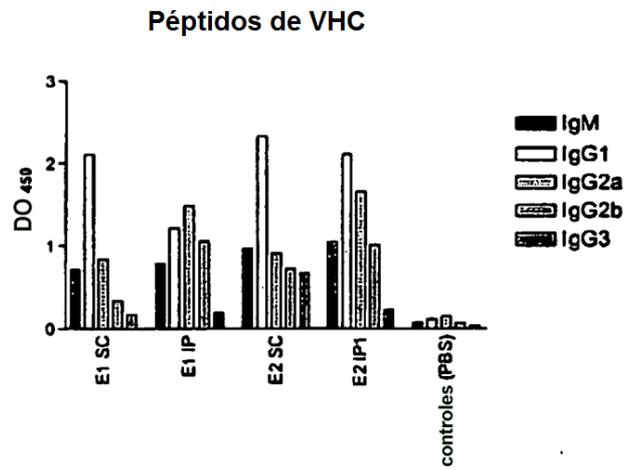


Fig. 8

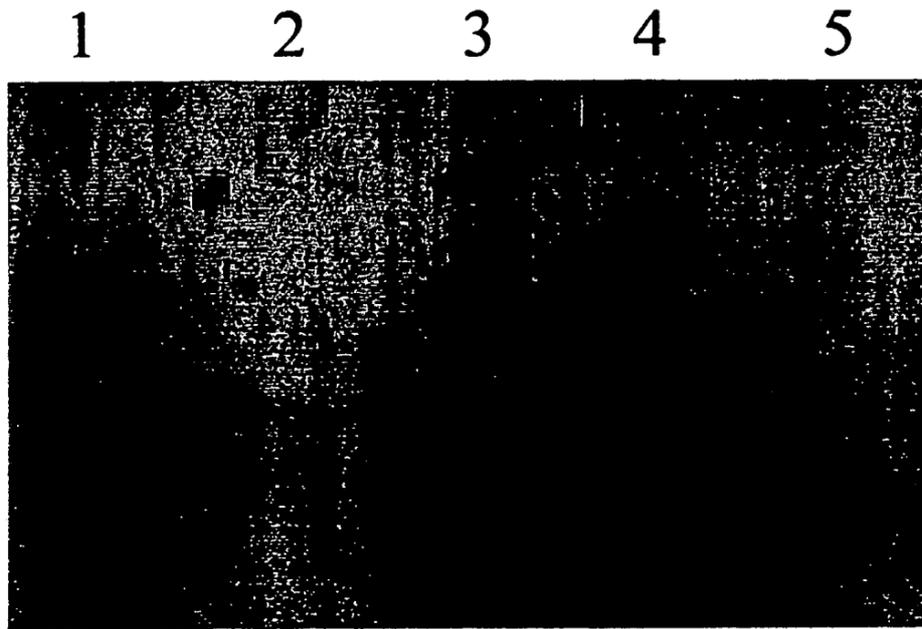


Fig. 9